

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**BIODIVERSIDAD DE CIANOBACTERIAS EN RÍOS DE
LA COMUNIDAD DE MADRID. ANÁLISIS POLIFÁSICO
Y APLICACIÓN EN BIOMONITORIZACIÓN.**



TESIS DOCTORAL
Virginia Loza Calvo
Madrid, 2011

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor de Ciencias

Madrid, a 10 de Mayo de 2011

Fdo. Virginia Loza Calvo
Licenciada en Ciencias Ambientales

DIRECTORA

Fdo. Dra. Pilar Mateo Ortega
Catedrática
Dpto. Biología
Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección de la doctora Pilar Mateo Ortega (Catedrática. UAM). Financiado por el proyecto C.A.M.: S-0505/AMB/0321.

A mi familia

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAN – medio Allen y Arnon

BLAST – acrónimo del inglés Basic Local Alignment and Search Tool

BSA – albúmina de suero bovino del inglés “bovine serum albumine”

CTAB - N-Cetil-N,N,N-Trimetilamonio bromuro

DGGE – electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente químico del inglés
Desnaturing gradient gel electrophoresis

dNTPs – desoxinucleótidos trifosfatos

EDTA - ácido etileno diamino tetra acético, acrónimo del inglés ethylene diamine
tetra acetic acid

HEPES - N-(2-Hidroxietil) piperazina- N’-(2-ácido etanosulfónico)

kb – kilo bases

L - litro

LB – iniciales de las palabras inglesas Lysogeny broth (caldo lisogénico)

ML – maximum likelihood

MP – maximum parsimony

NCBI – acrónimo del inglés Nacional Center for Biotechnology Information

NID – nitrógeno inorgánico disuelto

NJ – neighbour-joining

pb – pares de bases

PCR - reacción en cadena de la polimerasa, del inglés polymerase chain reaction

Pk- Punto kilométrico

PRS - fósforo reactivo soluble

RFLPs - polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN, del inglés
restriction fragment length polymorphisms

rpm - revoluciones por minuto

T^a agua – temperatura del agua

T^a amb – temperatura ambiente

TAE – tris acético tampon

TEMED – N,N,N’,N’ - tetrametiletilenediamina

TGGE - electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico del inglés
temperature gradient gel electrophoresis

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. CIANOBACTERIAS. CARACTERÍSTICAS GENERALES	1
I.1. Organización celular	2
I.1.1. Célula vegetativa	2
I.1.2. Células especializadas	4
I.2. Metabolismo	5
I.3. Ecología. Distribución de las cianobacterias	6
II. DIVERSIDAD MORFOLÓGICA. TAXONOMÍA	8
II.1. Orden Oscillatoriales. Subsección III	14
II.1.1. Clasificación taxonómica	15
III. DIVERSIDAD GENÉTICA. TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE CIANOBACTERIAS.	16
III.1. Subunidad del ARN ribosómico 16S (ARNr 16S)	18
III.2. Técnicas de perfiles genéticos o “fingerprinting”	19
IV. LA CALIDAD DE LAS AGUAS FLUVIALES	21
V. LA BIOMONITORIZACIÓN	23
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	25
MATERIALES Y MÉTODOS	29
I. ZONA DE ESTUDIO	29
I.1. Río Manzanares	30
I.2. Río Guadalix	30
I.3. Arroyo Mediano	32
I.4. Río Guadarrama	33
II. RECOGIDA DE MUESTRAS	36
III. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL AGUA	37
III.1. ANÁLISIS <i>IN SITU</i>	37
III.2. DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS DEL AGUA	38
IV. ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD EPILÍTICA	40
IV.1. TÉCNICAS DE CULTIVO DE CIANOBACTERIAS	40
IV.1.1. Medios de cultivo	40
IV.1.2. Condiciones de cultivo y de siembra	43
IV.2. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE CIANOBACTERIAS	43

IV.2.1. Aislamiento de cianobacterias del epilíton	43
IV.2.2. Aislamiento de cepas a partir de colonias de cianobacterias	44
IV.3. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CIANOBACTERIAS	44
IV.3.1. Microscopía óptica.....	44
IV.3.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	45
IV.4. TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA: BIOENSAYOS CON ESPECIES DE CIANOBACTERIAS	46
IV.4.1. Ensayos de competencia en sustrato artificial	46
IV.4.2. Gradiente de nutrientes	47
IV.5. TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CIANOBACTERIAS	49
IV.5.1. Aislamiento de ADN genómico de cianobacterias	49
IV.5.2. Determinación del gen ARNr 16S en cianobacterias mediante PCR	50
Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S	50
Secuenciación	51
IV.5.3. Clonación de los fragmentos amplificados del gen ARNr 16S	52
Medios de cultivo empleados para <i>E.coli</i>	52
Preparación de bacterias competentes	53
Transformación	54
Obtención del fragmento clonado del gen ARNr 16S	54
IV.5.4. Estudios de biodiversidad de cianobacterias mediante el análisis del ADNr 16S empleando TGGE	55
Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S	55
Utilización de TGGE en la separación de los amplicones del gen ARNr 16S	55
Recuperación de los amplicones de los geles de poliacrilamida	56
IV.5.5. Procesamiento y análisis filogenético de las secuencias obtenidas	57
IV.6. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	58
IV.6.1. Análisis de los experimentos ecofisiológicos de competencia	58
IV.6.2. Análisis digital de los geles de TGGE	58

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
I. Abundancia y estructura de la comunidad de cianobacterias en relación con la calidad del agua.	63
I.1. Características físico-químicas del agua del río	
Guadarrama: calidad del agua.	63
I.2. Descripción de las especies de cianobacterias epilíticas en el río	
Guadarrama: identificación taxonómica	67
I.3. Estructura y distribución de la comunidad de cianobacterias.	76
I.4. Caracterización genética y análisis filogenético de las cianobacterias aisladas	80
I.5. Discusión	84
II. Bioensayos con especies de cianobacterias potencialmente bioindicadoras.	93
II.1. Introducción.	93
II.2. Estudio de competencia en sustrato artificial	94
II.3. Bioensayos de competencia en un gradiente de nutrientes	99
II.3.1. Efectos de las diferentes concentraciones de amonio en el crecimiento de las especies.	100
II.3.2. Efectos de las diferentes concentraciones de nitrato en el crecimiento de las especies	103
II.3.3. Efectos de las diferentes concentraciones de fosfato en el crecimiento de las especies	103
II.4. Discusión.....	108
III. Análisis de la diversidad de cianobacterias mediante TGGE.....	113
III.1. Introducción	113
III.2. Análisis de los perfiles de TGGE de la región ARNr 16S	114
III.3. Análisis digital y estadístico de las bandas	116
III.4. Análisis filogenéticos de las secuencias obtenidas	119
III.5. Distribución de los genotipos con respecto a las variables ambientales ..	125
III.6. Discusión	132
IV. Estudio polifásico de muestras naturales y cepas aisladas de los géneros <i>Phormidium</i> y <i>Oscillatoria</i>	139
IV.1. Introducción.....	139

IV.2. Características físico-químicas de los ríos.....	140
IV.3. Caracterización morfológica y ultraestructural	142
IV.4. Análisis mediante TGGE de la región ARNr 16S.....	148
IV.5. Caracterización genética y análisis filogenético mediante el empleo del gen ARNr 16S.....	149
IV.6. Características ecológicas.....	153
IV.7. Discusión	154
CONCLUSIONES	161
BIBLIOGRAFÍA	165

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. CIANOBACTERIAS. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las cianobacterias constituyen un grupo muy diverso de organismos procariotas, pertenecientes al dominio *Bacteria*, capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica (Whitton, 1992). Entre sus pigmentos fotosintéticos, destacan la clorofila *a* y las ficobilinas, dentro de las cuales, el pigmento de la ficocianina les concede el característico color azul (Whitton, 2000). A pesar de tener características fotosintéticas similares a las algas eucariotas y plantas superiores, su organización estructural y bioquímica se corresponde con el de bacterias gram-negativas (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Son organismos muy antiguos, su origen se remonta a comienzos del Precámbrico hace unos 3500 millones de años. Desde el punto de vista evolutivo tienen especial importancia, ya que posiblemente fueron los principales responsables de la oxigenación de la atmósfera terrestre, como consecuencia de la utilización del agua en el proceso de fotosíntesis (Stewart, 1978; Knoll, 1985), que le sirve como donador de electrones (Whitton, 1992).

Las cianobacterias presentan una gran distribución ecológica, colonizando numerosos ecosistemas, desde sistemas acuáticos hasta terrestres e incluso ambientes extremos como desiertos áridos (Boyer y col., 2002; García-Pichel y col., 2003) y fuentes termales (Norris y col., 2002; Steunou y col., 2006). Otra característica a destacar de estos organismos, es la capacidad que presentan algunas cianobacterias de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones aerobias, lo que les confiere un especial interés en temas agrícolas (Leganés y col., 2001; Ariosa y col., 2004; Fernández-Valiente y col., 2010), y les permite ser la población dominante en aguas extremadamente deficientes en nitrógeno (Hyenstrand et al, 1998).

Las cianobacterias muestran una considerable diversidad morfológica, pueden ser unicelulares (cocos y bacilos) hasta filamentosas, pudiendo presentar ramificaciones verdaderas o falsas (Whitton, 1992). Gran parte de las cianobacterias suelen encontrarse en la naturaleza formando grupos de células o filamentos en forma de colonias características, e incluso formando tapetes microbianos asociados con otros microorganismos. Finalmente, hay que destacar que las cianobacterias son capaces de formar relaciones simbióticas con gran cantidad de organismos, desde plantas (Rasmussen y Svenning, 2001) como con hongos y animales invertebrados (Wilkinson

y Fay, 1979, Kneip y col., 2007) en ambientes terrestres, desempeñando un papel importante en el funcionamiento del ecosistema y en el ciclo de nutrientes.

Otro aspecto importante es la aparición de afloramientos masivos de algunas cianobacterias, que pueden ser visibles a simple vista cuando se generan densas concentraciones cerca de la superficie (Hense y Beckmann, 2006). Por último, se han descrito algunas cepas de cianobacterias capaces de producir toxinas, las cuales causan efectos adversos en los organismos (Kaebernick y Neilan, 2001; Quesada y col, 2006). Este fenómeno ha sido más estudiado en embalses (Dyble y col, 2002; Padilla y col, 2006; Carrasco y col. 2007; Ledreux y col., 2010) pero se ha encontrado también entre especies bénticas de ríos (Aboal y col., 2002; 2005; Aboal y Puig, 2009).

I.1. Organización celular.

La estructura celular de las cianobacterias es común a todas ellas aunque exista una gran diversidad morfológica entre los diferentes grupos. Las células vegetativas pueden sufrir un proceso de diferenciación celular dando lugar a células especializadas como son los heterocistos y acinetos.

I.1.1. Célula vegetativa

Las células vegetativas constituyen el tipo celular básico de todas las cianobacterias, cuya disposición general se muestra en la **figura 1**.

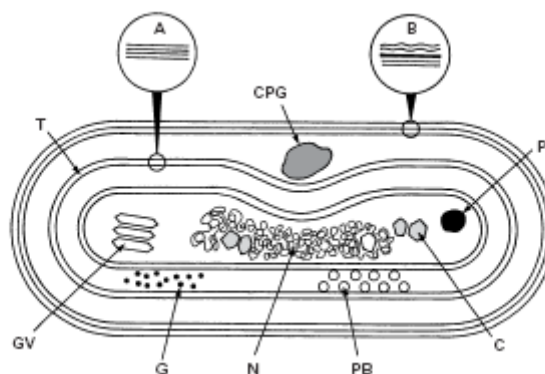


Figura 1. Esquema de la sección de una célula vegetativa de cianobacteria. Abreviaturas: A.- Detalle del tilacoide mostrando las membranas tilacoidales; B.- Detalle de la envoltura celular mostrando la membrana extrema, la capa de peptidoglicano y la membrana citoplasmática; C.- carboxisoma; CPG.- granulo de cianoficina; T.- tilacoide; P.- gránulo de polifosfato; N.- región nucleoplásmica; G.- gránulos de glucógeno; PB.- ficobilisoma; GV.- vesícula de gas. (tomada de Adams y Duggan, 1999).

Presentan una membrana plasmática rica en sistemas enzimáticos, rodeada a su vez por una pared celular del tipo Gram-negativa interrumpida por pequeños poros (Castenholz, 1989a). La capa más interna de la pared celular está formada por peptidoglicano el cual le confiere sensibilidad a las cianobacterias frente a lisozima y penicilina (Frank y col., 1962). En numerosos tipos de cianobacterias, las células vegetativas poseen una envuelta exterior a la membrana externa denominada vaina mucilagínosa o cápsula, constituida por polisacáridos producidos dentro de las células y excretados por ellas, que suponen principalmente una ventaja adaptativa contra la desecación (Walsby, 1974) y contribuyen a la formación de agregados (Drews y Weckesser, 1982).

El genoma de las cianobacterias está formado por ADN bicatenario y circular (Makino y Tsuzaki, 1971) no unido a histonas situado en el centro del citoplasma. En algunas estirpes se conoce la presencia de intrones dentro del genoma bacteriano (Xu y col., 1990) así como de plásmidos (Thiel, 1994). También se encuentran dispersos por el citoplasma los ribosomas de tipo bacteriano (70S) (Rodríguez-López y Vázquez, 1968) y una serie de gránulos, que generalmente contienen sustancias de reserva, cuya abundancia depende de las condiciones en que se encuentren las especies. Estos gránulos pueden ser polifosfatos (reserva de fósforo) (Healey, 1982), de cianoficina (reserva de compuestos nitrogenados) (Simon, 1987), de glucógeno y de poli- β -hidroxibutirato (reserva de carbono) (Shively, 1988; Castenholz, 2001). También podemos encontrar otras estructuras denominadas carboxisomas o cuerpos poliédricos, que acumulan ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa (Smith, 1982; Orús y col., 1995) y vacuolas de gas, que son importantes pues permiten el desplazamiento en la columna de agua de las cianobacterias (Walsby, 1975; Hayes, 1988). Los elementos citoplasmáticos más conspicuos son los tilacoides, situados en la periferia del citoplasma de forma paralela, los cuales contienen los pigmentos fotosintéticos y las cadenas de transporte de electrones fotosintética y respiratoria (Gantt, 1994). El aparato fotosintético de las cianobacterias emplea el agua como donador de electrones para la obtención de poder reductor. Esta compuesto por dos fotosistemas (PSI y PSII) y por una cadena de transporte electrónico similar a la de organismos eucariotas (Stewart, 1980; Schmetterer, 1994). Los pigmentos fotosintéticos que poseen las cianobacterias son: clorofila a, componente del fotosistema I y principal colector de energía; carotenoides, con función protectora contra la oxidación de los pigmentos (Stanier y col., 1971) y ficobiliproteínas, presentes sólo en cianobacterias y algunas algas (Cohen-

Bazire y Bryant, 1982). Las ficobiliproteínas pueden ser ficocianina y aloficocianina presentes en todas las cianobacterias, así como ficoeritrina y ficoeritrocianina con menor frecuencia. Son muy eficientes en la captación de energía, formando parte del sistema antena en unos complejos multimoleculares denominados ficobilisomas, cediéndola mayoritariamente al fotosistema II (Sidler, 1994). Además, son la porción nitrogenada de la célula con mayor capacidad de movilización, variando su proporción en función de la fuente de nitrógeno que exista en el medio (Allen y Smith, 1969).

I.1.2. Células especializadas

Además de las células vegetativas descritas anteriormente, algunas cianobacterias son capaces de diferenciar diferentes tipos de células especializadas con diferencias tanto a nivel morfológico como en la organización estructural y fisiológica. Esto les permite adaptarse a los distintos hábitats en los que se pueden encontrar.

Los heterocistos son células especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico en condiciones aerobias, gracias a la presencia de la enzima nitrogenasa en su interior (Wolk y col., 1994). La diferenciación de una célula vegetativa en heterocisto es irreversible y se produce bajo condiciones de ausencia de nitrógeno combinado (Whitton, 1992). Poseen una envoltura muy gruesa para impedir la difusión del O₂ que inhibe a la enzima (Cardemil y Wolk, 1981), así como unos gránulos polares en el sitio de unión con las células vegetativas con un alto contenido en cianoficina. La forma, número y colocación de este tipo de células en el tricoma, es un carácter taxonómico empleado en el sistema de clasificación tradicional (Komárek y Anagnostidis, 1989).

Los acinetos son formas esporuladas que se diferencian a partir de células vegetativas cuando las condiciones ambientales no son las adecuadas. Son formas celulares de resistencia que generalmente se inducen en condiciones limitantes de fósforo, luz o por la presencia de carbohidratos como fuente de energía (Nichols y Adams, 1982). Cuando las condiciones vuelven a ser favorables, tienen la capacidad de germinación para producir nuevos filamentos (Rother y Fay, 1977).

Otra forma de especialización celular la componen los hormogonios. Son producidos por muchas cianobacterias filamentosas a partir de la muerte de una o más células intercalares denominadas necridios (Economou-Amilli y col., 1984), o bien por la separación entre dos células contiguas, pero en ambos casos la formación de los hormogonios depende de las condiciones del medio (Wood y col., 1986). La función principal es la de reproducción (Fay, 1983) y dispersión ya que pueden tener movilidad

(Whitton, 1992) y además pueden adherirse a superficies sólidas (Herdman, 1982). Los hormogonios pueden ser también unicelulares, en cuyo caso se denominan gonidios (Geitler, 1932).

I.2. Metabolismo.

Los elementos químicos fundamentales implicados en el metabolismo de las cianobacterias son el carbono, el nitrógeno y el fósforo. En cuanto a la fuente de carbono, se pueden presentar tres tipos de metabolismo: fotoautotrofismo, cuando utilizan carbono inorgánico en la fotosíntesis oxigénica; fotoheterotrofismo, cuando la fotosíntesis sólo proporciona energía en forma de ATP y necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono y quimioheterotrofismo, cuando son capaces de crecer en oscuridad, utilizando un compuesto orgánico como fuente de carbono y de energía (Smith, 1982). Algunas cianobacterias pueden usar alternativamente H_2O y H_2S como fuentes de poder reductor y pueden así crecer fotosintéticamente en medios aerobios y anaerobios (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993).

Mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato, las cianobacterias acumulan glucógeno en presencia de luz, constituyendo la principal reserva de carbono de estos organismos. Posteriormente el glucógeno puede ser utilizado en oscuridad mediante la respiración como fuente principal de energía, en el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (Pelroy y Bassham, 1972). De este modo, el ciclo de las pentosas supone un mecanismo de concentración de CO_2 en el que interviene la enzima Rubisco (Badger y Price, 1990), que mejora la eficiencia de la fotosíntesis en la fijación de carbono inorgánico (Miller y col., 1990).

En cuanto al nitrógeno, las cianobacterias son capaces de utilizar varias formas de este elemento para su crecimiento (NO_3^- , NH_4^+ , N_2), aunque prefieren tomar la forma catiónica (Guerrero y Lara, 1987). Independientemente de su origen, el nitrógeno es incorporado a la materia orgánica en forma de NH_4^+ (Stewart, 1980; Flores y Herrero, 1994). Algunas de ellas tienen la capacidad de reducir biológicamente el N_2 atmosférico, mediante la actuación de la enzima nitrogenasa localizada generalmente en los heterocistos, aunque algunas cianobacterias no tienen heterocistos y pueden fijarlo también, alternando este proceso con los fotosintéticos (Mitsui y col., 1986).

Respecto al fósforo, las cianobacterias lo toman en forma de ortofosfatos, mediante uno o varios sistemas de transporte activo o bien pasivo, cuando existen concentraciones altas en el medio, incorporándose después a las distintas rutas

metabólicas (Healey, 1982). También tienen la capacidad de utilizar fosfatos orgánicos, gracias a la presencia de enzimas fosfatasas (Grossman y col., 1994; Whitton y col., 2005).

I.3. Ecología. Distribución de las cianobacterias.

Debido a su gran variedad morfológica, estructural y fisiológica, las cianobacterias pueden estar distribuidas en todo tipo de hábitats. Muchas especies son cosmopolitas y están distribuidas por todo el mundo (Willmotte, 1994; Whitton y Potts, 2000). Son capaces, por tanto, de tolerar distintos tipos de ambientes y adaptarse a cambios de luz, salinidad, temperatura, humedad, disponibilidad de oxígeno, radiación, disponibilidad de nutrientes, etc. Forman parte importante de ecosistemas terrestres, acuáticos de agua dulce y salada, donde se encuentran poblaciones planctónicas, bentónicas, intertidales, etc. (Fay, 1983). En el medio marino, la presencia de cianobacterias supone la principal contribución de la producción primaria, afectando de manera notable a los ciclos de nutrientes y a la estructura de la comunidad acuática en los océanos (Paerl, 2000). Las distintas estrategias de adaptación de estos organismos, tanto morfológicas como fisiológicas, les permite optimizar sus capacidades (fijación de nitrógeno, fotosíntesis y captación de nutrientes) y dominar así en océanos oligotróficos del mundo. Mientras que las cianobacterias planctónicas marinas son poco abundantes, existen densas poblaciones bénticas en los fondos marinos las cuales pueden constituir tapetes microbianos o asociaciones junto con otros organismos, como también, formaciones sobre rocas y sedimentos especialmente en la zona intertidal (Whitton, y Potts, 1982). Sin embargo, es en los ecosistemas dulceacuícolas (lagos, ríos, arroyos, etc.) donde se encuentra una gran diversidad de cianobacterias. Aquellas cianobacterias picoplanctónicas están ampliamente distribuidas en lagos y embalses, llegando incluso a generar afloramientos masivos de las mismas en la superficie, bajo ciertas condiciones nutricionales y ambientales (Dasey y col, 2005; Carrasco y col, 2006). A pesar de mostrar un crecimiento favorable bajo condiciones que se podrían considerar extremas, presentan algunas limitaciones en lo que se refiere al pH del medio. Así, no son capaces de crecer en condiciones de pH inferiores a 4 (Whitton, 1992), mientras que las cianobacterias tienen preferencia por las aguas neutras o alcalinas. Gran parte de las cianobacterias filamentosas suelen formar parte del bentos (Perona y col., 1998; Aboal y col., 2002; O'Sullivan y col., 2002) gracias a que poseen vainas que protegen los

tricomas permitiéndoles adherirse a distintas superficies, lo que les permite adaptarse a ambientes muy heterogéneos (Margalef, 1983).

Las cianobacterias también colonizan numerosos ecosistemas terrestres, siempre que exista algún recurso de agua aunque sea de forma intermitente (Hoffman, 1988a) o incluso en ambientes tan extremos como los desiertos. En este caso, gracias a las distintas adaptaciones desarrolladas frente a la desecación como la formación de vainas frente a la salinidad y la acumulación de compuestos osmoprotectores (Reed y col., 1986) les permite aguantar largos períodos de sequía (Friedman, 1980). Además, estos organismos juegan un papel primordial en el mantenimiento de la estabilidad de la superficie del suelo en zonas semidesérticas mediante el desarrollo de estructuras biológicas del suelo o “*biological soil crust*” (García-Pichel y col., 2003) compuestas junto con otros microorganismos (algas verdes, musgos, líquenes, hongos, etc.), favoreciendo además la fertilidad de suelos destinados al cultivo en regiones áridas.

Otras adaptaciones similares se producen cuando existen altos niveles de radiación ultravioleta (B y C) o altas temperaturas típicos de ambientes extremos. Así por ejemplo, la presencia de pigmentos en las vainas de cianobacterias filamentosas de ambientes naturales, como es el caso de la escitonemina, les permite protegerse de una elevada irradiación solar (García-Pichel y Castenholz, 1991; Soule y col., 2009). En conjunto, les permite dominar hábitats tan inhóspitos como son los cráteres volcánicos, fuentes termales (McGregor y Rasmussen, 2008), lagos alpinos o polares (Quesada y Vincent, 1997; Fernández-Valiente, y col., 2007) y ambientes hipersalinos (López-Cortés y col., 2001; Banerjee y col., 2009).

Se han descrito algunas especies de cianobacterias endolíticas o euendolíticas capaces de excavar (proceso de “boring”) activamente sustratos carbonatados (Golubic y col., 1981) de distinta naturaleza, ya sea de vetas de un sustrato rocoso carbonatado (Pentecost y Whitton, 2000), invertebrados con concha (Kaehler, 1999) o sustratos coralinos (Le Campion-Alsumard y col., 1995). Dicho proceso constituye el mayor impacto erosivo el cual contribuye tanto a la morfogénesis costera y terrestre de piedra caliza (Trudgill, 1987; Shachak y col., 1987) como a la destrucción de los arrecifes de coral (Aline, 2008). Tanto los estudios previos de identificación y distribución de estas cianobacterias (Campbell, 1983; Golubic y col., 1984) como los estudios polifásicos posteriores (Chacón y col., 2006; Garcia-Pichel, 2006) han ayudado a esclarecer en la actualidad algunos de los mecanismos implicados en dicho proceso de “boring” como la

toma y el transporte de Ca^{2+} mediante una P-ATPasa a través del tricoma (Garcia-Pichel y col., 2010).

Finalmente, estos organismos presentan distintas estrategias para competir en ambientes donde existe una disminución de nutrientes en el medio, como son el nitrógeno y el fósforo (Whitton, 1992). Como se ha comentado anteriormente, en los casos donde el nitrógeno es limitado, algunas cianobacterias pueden fijar nitrógeno atmosférico mediante células especializadas (heterocistos) permitiéndoles sobrevivir donde otros organismos están limitados. En ambientes carentes de fósforo, pueden ser empleadas las reservas de fósforo almacenadas en los gránulos de polifosfato. Se ha observado que la capacidad de acumulación y utilización de polifosfato puede ofrecer a ciertas cianobacterias cierta ventaja a la hora de sobrevivir en ambientes pobres en nutrientes y con aportes de P discontinuos (Mateo y col., 2006). Además, las cianobacterias pueden presentar enzimas fosfatasas unidas a la superficie externa de la membrana celular, lo que les permite obtener el fósforo inorgánico de fácil asimilación a partir de compuestos orgánicos (Healey 1982; Whitton y col., 2005). Una de las estrategias que se pueden observar en su morfología es la formación de pelos multicelulares, los cuales permiten aumentar el área de distribución de dichas enzimas haciendo más eficiente la toma de este nutriente.

II. DIVERSIDAD MORFOLÓGICA. TAXONOMÍA

Las cianobacterias son un grupo de procariotas desde el punto de vista morfológico muy diverso. Por mucho tiempo, fue considerada por los botánicos (y es considerada todavía por algunos) como una de las principales divisiones de las algas, incluida en la división Cyanophyta o algas verde-azuladas (Compère, 2005). Este sistema tradicional de clasificación, representa un gran volumen de trabajo que se ha ido acumulado a lo largo de los años, desde la introducción del sistema de nomenclatura binomial por Linnaeus en 1750. Con los trabajos de Bornet y Flahault (1886-1988) y Gomont (1892) se escribieron los primeros manuales exhaustivos para la determinación de especies filamentosas cianobacterianas. En los años treinta, Geitler (1932) llevó a cabo una revisión taxonómica exhaustiva, actualizada y empleada ampliamente. Posteriormente, aparecieron los trabajos de Elenkin (1936-1949), Desikachary (1959), Starmach (1966) y Bourrelly (1970a, b) entre otros. En la actualidad, se han realizado diferentes revisiones por Anagnostidis y Komárek (1990) y Komárek y Anagnostidis (1989, 1999 y 2005), proponiéndose el nuevo término cianoprocariota, en la que además

de las referencias históricas, se han incluido nuevas especies e introducido cambios importantes en la nomenclatura de algunos géneros, especialmente en las formas filamentosas sin heterocistos como *Oscillatoria*. Además proporciona una información valiosa sobre la distribución y ecología de las cianobacterias.

Según la tradición botánica, las cianobacterias se han distinguido en base a sus propiedades morfológicas, que incluyen principalmente la formación de la colonia, la morfología celular y envolturas extracelulares, pigmentación, reproducción y en menor medida, en base a sus propiedades fisiológicas y bioquímicas. Este sistema de clasificación, gobernado por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (Greuter y col., 2000), requiere como referencia taxonómica muestras fijadas y preservadas, como muestras de herbarios (Palinska y col., 2006). Se han publicado y aceptado alrededor de 2000 especies de cianobacterias bajo este código. Todas ellas, quedan englobadas en los 4 órdenes siguientes (Tabla 1):

***Orden Chroococcales:** Incluye a todas las unicelulares y se agrupan en función de los tipos de células, las envueltas y el tipo de reproducción (Komárek y Anagnostidis, 1999).

***Orden Oscillatoriales:** Incluye aquellas con organización en filamentos, generalmente se reproducen por fragmentación del tricoma formando hormogonios y carecen de heterocistos y acinetos. Algunas pueden presentar una vaina recubriendo los tricomas (Komárek y Anagnostidis, 2005).

***Orden Nostocales:** Agrupa aquellas filamentosas provistas de heterocistos y acinetos. Así como células de dispersión como los hormogonios. Se agrupan en función de la morfología de las colonias, los filamentos, así como por la diferenciación y posición de los heterocistos y la diferenciación de acinetos (Komárek y Anagnostidis, 1989).

***Orden Stigonematales:** Formada por filamentosas con un talo morfológicamente complicado. Su diferenciación se realiza principalmente en función de la estructura de los filamentos, tipo de ramificación, posición de los heterocistos y procesos reproductivos (Anagnostidis y Komárek, 1990).

Tabla 1. Esquema de la taxonomía botánica de la nueva aproximación de las cianofitas, según la nomenclatura botánica Komàrek y Anagnostidis (1989, 1999, 2005) y Anagnostidis y Komàrek (1990).

ORDEN	FAMILIA	ALGUNOS GÉNEROS	
CHROOCOCCALES	Synechococcaceae	<i>Cyanothece</i>	<i>Aphanothece</i>
	Merismopediaceae	<i>Merismopedia</i>	<i>Synechocystis</i>
		<i>Aphanocapsa</i>	
	Mycrocystaceae	<i>Eucapsis</i>	
	Chroococcaceae	<i>Chroococcus</i>	
	Entophysalidaceae	<i>Siphononema</i>	<i>Entophysalis</i>
	Hydrococcaceae	<i>Hydrococcus</i>	
	Chamaesiphonaceae	<i>Chamaesiphon</i>	<i>Chamaecalyx</i>
	Dermocarpellaceae	<i>Cyanocystis</i>	<i>Stanieria</i>
	Xenococcaceae	<i>Xenococcus</i>	<i>Chroococciopsis</i>
		<i>Chroococcidium</i>	
	Hyellaceae	<i>Hyella</i>	<i>Pleurocapsa</i>
OSCILLATORIALES	Borziaceae	<i>Borzia</i>	<i>Komvophoron</i>
	Pseudanabaenaceae	<i>Pseudanabaena</i>	<i>Leptolyngbya</i>
		<i>Limnothrix</i>	
	Schizotrichaceae	<i>Schizotrix</i>	
	Phormidiaceae	<i>Phormidium</i>	<i>Trichodesmium</i>
		<i>Arthrospira</i>	<i>Microcoleus</i>
	Oscillatoriaceae	<i>Oscillatoria</i>	<i>Plectonema</i>
		<i>Lyngbya</i>	<i>Homeothrix</i>
	Gomontiellaceae	<i>Katagnymene</i>	<i>Gomontiella</i>
NOSTOCALES	Scytonemataceae	<i>Scytonema</i>	<i>Scytonemetopsis</i>
	Microchaetaceae	<i>Microchaete</i>	<i>Tolypothrix</i>
		<i>Petalonema</i>	<i>Hassallia</i>
	Rivulariaceae	<i>Calothrix</i>	<i>Rivularia</i>
		<i>Gloetrichia</i>	
	Nostocaceae	<i>Cilindrospermum</i>	<i>Nodularia</i>
		<i>Anabaena</i>	<i>Nostoc</i>
STIGONEMATALES	Chlorogloeopsaceae	<i>Chlorogloeopsis</i>	
	Capsosiraceae	<i>Capsoria</i>	<i>Desmosiphon</i>
	Stigonemataceae	<i>Pulvinularia</i>	<i>Stigonema</i>
	Fischerellaceae	<i>Fischerella</i>	<i>Doliocatella</i>
	Bourzinemataceae	<i>Borzinema</i>	<i>Seguenzaea</i>
	Loriellaceae	<i>Geitleria</i>	<i>Loriella</i>
	Nostochopsaceae	<i>Nostochopsis</i>	<i>Mastigocoleus</i>
	Mastigocladaceae	<i>Bachytrichia</i>	<i>Mastigocladus</i>

En la década de los setenta con el reconocimiento de las características bacterianas de este grupo, surgió un nuevo sistema de clasificación, basado en los criterios establecidos por el Código Internacional Bacteriológico de Nomenclatura (Lapage y col., 1992). Las primeras aproximaciones fueron realizadas por Stainer y Cohen-Bazire (1977), seguidos por Waterbury y Stainer (1977) y Rippka y col. (1979) entre otros, siendo estos últimos, los que diseñaron las primeras claves para determinar cianobacterias en cultivo.

A diferencia del sistema tradicional, el sistema bacteriológico esta basado en algunas características morfológicas, fisiológicas, citológicas y bioquímicas de cultivos axénicos de especies aisladas, como la composición de pigmentos, análisis de ácidos grasos, crecimiento heterotrófico, actividad nitrogenásica, composición nucleotídica del ADN y longitud del genoma (Wilmotte, 1994). Además requiere como referencia taxonómica básica muestra viva, que sea cultivada en una de las colecciones de cianobacterias oficiales existentes en el mundo. A partir de las diferencias en la organización celular y en el modo de reproducción, las cianobacterias se agruparon en 5 secciones (Rippka y col., 1979; Tabla 2).

***Sección I:** Formada por cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión binaria o gemación. Las células pueden ser esféricas, cilíndricas u ovales y, pueden encontrarse aisladas o formando agregados (ejemplo: *Synechococcus*).

***Sección II:** Formada por cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión múltiple, dando lugar a células reproductivas esféricas de menor tamaño, denominadas baeocitos (ejemplo: *Chamaesiphon*).

***Sección III:** Incluye a las cianobacterias filamentosas sin heterocistos que se dividen en un solo plano. La reproducción se realiza por fragmentación de los filamentos y, a veces por la formación de hormogonios o mediante la germinación de acinetos (ejemplo: *Phormidium*).

***Sección IV:** Agrupa a las cianobacterias filamentosas provistas de heterocistos que se dividen en un solo plano. La reproducción se realiza por fragmentación del tricoma, formación de hormogonios o germinación de acinetos (ejemplo: *Nostoc*).

***Sección V:** Agrupa a las cianobacterias filamentosas provistas de heterocistos, con división de células en más de un plano, dando lugar a filamentos ramificados. La reproducción se lleva a cabo igual que en las cianobacterias de las dos secciones anteriores (ejemplo: *Mastigocladus*).

Tabla 2. Resumen de la taxonomía de las cianobacterias según el Código Bacteriológico de Nomenclatura (Rippka y col., 1979).

SECCIÓN I			
Unicelulares	división por fisión binaria	<i>Glerobacter</i> <i>Gleothece</i> <i>Synechococcus</i>	<i>Gloeocapsa</i> <i>Synechocystis</i>
	división por gemación	<i>Chamaesiphon</i>	
SECCIÓN II			
Unicelulares con reproducción por fisión múltiple	división por fisión múltiple	<i>Dermocarpa</i>	<i>Xenococcus</i>
	división por fisión múltiple y binaria	<i>Dermocapella</i> <i>Mysosarcina</i>	<i>Chroococidiopsis</i> <i>Grupo Pleurocapsa</i>
SECCIÓN III			
Filamentos sin heterocistos y división en un solo plano	tricoma helicoidal		<i>Spirulina</i>
	tricomas rectos	<i>Oscillatoria</i> <i>Grupo LPP A</i>	<i>Pseudanabaena</i> <i>Grupo LPP B</i>
SECCIÓN IV			
Filamentos con heterocistos y división en un plano	sin hormogonios	<i>Anabaena</i> <i>Nodularia</i>	<i>Cylindrospermum</i>
	con hormogonios	<i>Nostoc</i> <i>Scytonema</i>	<i>Calothrix</i>
SECCIÓN V			
Filamentos con heterocistos, división en más de un plano		<i>Chlorogloeopsis</i>	<i>Fischerella</i>

Posteriormente, Castenholz y Waterbury en la primera edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Boone y Castenholz, 1989), realizaron una rigurosa revisión de algunos de los géneros más importantes, basándose en las características morfológicas (célula, tricoma y colonia), ultraestructurales, fisiológicas y ecológicas, así como en la análisis del porcentaje de G+C del genoma e hibridación ADN-ADN. Mediante esta aproximación, fueron reconocidos cinco órdenes bastante similares a los reconocidos por el sistema tradicional. Además, se comprobó que numerosos organismos que en el pasado fueron considerados estrechamente relacionados desde el punto de vista filogenético, ahora no lo son.

En la actualidad, los esquemas publicados por Rippka y col. (1979) y en el *Bergey's Manual* (Boone y Castenholz, 1989) se han revisado en la nueva versión de este manual (Boone y Castenholz, 2001), utilizando para ello las interpretaciones filogenéticas basadas en las secuencias del gen que codifica para el ARN ribosómico de

16S (ARNr 16S). En esta última edición, se incluye información recopilada tanto de fuentes bacteriológicas como fisiológicas, que han permitido distinguir 5 subsecciones (I-V), equivalentes a los órdenes establecidos en la literatura botánica. Este sistema de clasificación se muestra resumido en la tabla siguiente:

Tabla 3. Clasificación de cianobacterias según *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Boone y Castenholz, 2001). Los nombres en paréntesis se corresponden con los nombres de los taxones según el sistema botánico.

CLASE	Subsección	Parte	Géneros
CIANOBACTERIA	I (Chroococcales)	I	<i>Chamaesiphon</i> , <i>Chroococcus</i> , <i>Cyanobacterium</i> , <i>Cyanobium</i> , <i>Cyanothece</i> , <i>Dactylocopsis</i> , <i>Gloeobacter</i> , <i>Gloeocapsa</i> , <i>Gloeotheca</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Prochlorococcus</i> , <i>Prochloron</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i>
	II (Pleurocapsales)	I	<i>Cyanocystis</i> , <i>Dermocarpella</i> , <i>Stanieria</i> , <i>Xenococcus</i>
		II	<i>Chroococcidiopsis</i> , <i>Myxosarcina</i> , <i>Pleurocapsa</i>
	III (Oscillatoriales)	I	<i>Arthrospira</i> , <i>Borzia</i> , <i>Crinalium</i> , <i>Geitlerinema</i> , <i>Halospirulina</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Limnothrix</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Prochlorothrix</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Starria</i> , <i>Symploca</i> , <i>Trichodesmium</i> , <i>Tychonema</i>
	IV (Nostocales)	I	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cyanospira</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Scytonema</i>
		II	<i>Calothrix</i> , <i>Rivularia</i> , <i>Gloeotrichia</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Microchaete</i>
	V (Stigonematales)	I	<i>Chlorogloeopsis</i> , <i>Fischerella</i> , <i>Geitleria</i> , <i>Iyengariella</i> , <i>Nostochopsis</i> , <i>Mastigocladopsis</i> , <i>Westiella</i> , <i>Stigonema</i> , <i>Doliocatella</i>

El término “polifásico” empleado en el campo de la taxonomía fue introducido como respuesta al intento de integración de la información genotípica, fenotípica y filogenética (Vandamme y col., 1996; Anagnostidis y Komárek, 1985; Castenholz, 2001; Komárek, 2003). Con el paso del tiempo, ha resultado ser una herramienta valiosa para los bacteriólogos y particularmente para los cianobacteriólogos, en los estudios de diversidad cianobacteriana en diferentes ecosistemas (Casamatta y col., 2005; Willame y col., 2006; Brown y col., 2010; Heath y col., 2010).

La aplicación de técnicas moleculares como secuenciación génica, ultraestructura (disposición de los tilacoides en el interior celular; Komárek y Čáslavská, 1991; Komárek y Kaštovský, 2003) y caracterización ecofisiológica (vesículas de gas, adaptaciones a condiciones específicas, pelos en los organismos filamentosos) (Whitton, 1987; Lundgren y col., 2001), ha permitido obtener numerosos

e importantes datos taxonómicos en las últimas décadas. La gran disponibilidad de información ha hecho surgir la necesidad de adaptar el sistema de clasificación cianobacteriano actual, incorporando todos los datos disponibles hasta el momento. En este sentido, Hoffmann y col. (2005) han propuesto un nuevo sistema de clasificación para los organismos cianoprocarióticos, que intenta reflejar mejor las relaciones evolutivas de estos organismos, aunque actualmente no ha sido aceptado. Sin embargo, es evidente que ciertos órdenes y familias continúan siendo problemáticos y requieren más revisiones, por eso la clasificación debe ser cambiada, corregida y re-evaluada continuamente.

II.1. Orden Oscillatoriales. Subsección III.

Dado que uno de los capítulos que componen este trabajo tiene como objetivo el estudio de diversidad de especies del género *Phormidium* y *Oscillatoria*, se he dedicado este apartado a introducir sus particularidades taxonómicas, morfológicas y ecológicas. Los miembros del orden Oscillatoriales se caracterizan por ser cianobacterias filamentosas sin heterocistos y acinetos, cuyas células sufren división en un solo plano (Castenholz y col., 2001). Tradicionalmente, se han distinguido del resto de cianobacterias en base a la presencia o ausencia de vaina, apariencia del filamento, falsas ramificaciones y por el contenido de pigmentos celulares. A nivel de especie, los principales criterios taxonómicos empleados son el tamaño de la célula, las constricciones de los tabiques transversales, inclusiones celulares (granulación) y la forma de la célula (especialmente el de las células terminales de los tricomas) (Komárek y Anagnostidis, 2005).

La mayoría de las cianobacterias de este grupo presentan tricomas no atenuados, es decir, con ambos lados paralelos, aunque algunas veces, se estrechan hacia los extremos. La célula terminal puede diferir en la forma con respecto a las células adyacentes, pudiendo haber una modificación adicional en el exterior de la célula terminal, a modo de caperuza, membrana espesa o caliptra (Castenholz y col., 2001; Whitton, 2002). En algunos casos, los tricomas terminan en un pelo multicelular, como en la mayoría de las especies de *Homoeothrix* (Whitton, 2002). Pueden formar hormogonios estructuralmente similares a los tricomas vegetativos y, algunos miembros producen falsas ramificaciones (Rippka y col., 1979; Anagnostidis y Komárek, 1988). Todos los géneros y, probablemente todas las especies, son capaces de moverse bajo

algunas condiciones. Muchas formas planctónicas contienen vacuolas de gas, que pueden aparecer a lo largo del tricoma o localizarse cerca de los tabiques de separación.

Las cianobacterias del orden Oscillatoriales aparecen en una gran diversidad de hábitats, desde sistemas acuáticos hasta terrestres; pudiendo ser especies planctónicas o bentónicas y, formar parte del perifiton, de costras biológicas terrestres o tapetes microbianos. En diversos estudios realizados se han mostrado que los tapetes microbianos de lagos y charcas de la Antártida y del Ártico, generalmente están dominados por cianobacterias pertenecientes a este orden (Vincent, 2000; Casamatta y col., 2005; Taton y col., 2006b; Velázquez y col., 2011).

II.1.1. Clasificación taxonómica.

El Manual de Maurice Gomont, *Monographie des Oscillatoriées* (Gomont, 1892), fue el primer manual exhaustivo para la clasificación taxonómica de las Oscillatoriales. Posteriormente, Geitler (1932) realizó distinciones genéricas en este grupo, basadas principalmente en las propiedades de la vaina y la formación de la colonia. La separación de varios de estos géneros ha preocupado a los taxonomistas durante bastante tiempo (Elenkin, 1936-1949; Desikachary, 1959; Starmach, 1966), debido a que los caracteres empleados para distinguirlos, normalmente están influenciados por las condiciones ambientales. Ante este hecho, algunos taxonomistas optaron por la reducción drástica del número de géneros y especies (Drouet, 1968, 1981; Bourrelly 1970a, 1970b, 1985) o bien por la búsqueda de otros criterios que permitieran su clasificación (Anagnostidis y Komárek, 1988).

La inclusión de las cianobacterias dentro del código bacteriológico, Rippka y col., (1979) introdujeron un nuevo sistema de asignación de géneros. Así, dentro de las Oscillatoriales (ver tabla 2), se distinguieron los géneros tradicionales *Spirulina*, *Oscillatoria* y *Pseudanabaena*, además del grupo LPP (para los géneros *Lyngbya*, *Phormidium* y *Plectonema*), que a su vez se subdividió en LPP-A y LPP-B. El subgrupo LPP-A comprendía aquellas LPPs con tricomas de más de 3 µm de ancho y con células discoidales, mientras que el subgrupo LPP-B, incluiría tricomas de menos de 3 µm y con células cilíndricas o isodiamétricas. Las dos ediciones del *Bergey's Manual* (Boone y Waterbury, 1989; 2001) presentaron ligeras modificaciones con la incorporación de algunas descripciones genéricas derivadas de los estudios de muestras naturales. La diferencia principal entre dichas ediciones, fue el reconocimiento en la última versión del género *Leptolyngbya* Anagnostidis y Komárek 1988, *Geitlerinema* Anagnostidis

1989 y *Microcoleus* Desmazières 1823 para algunos miembros previamente asignados al grupo LPP-B (Rippka y col., 1979).

En los últimos años, Anagnostidis y Komárek (1988) y Komárek y Anagnostidis (2005) han realizado una revisión importante del orden Oscillatoriales, con la introducción de nuevos criterios taxonómicos, como proporciones celulares y patrones de división, existencia de aerotopos, movilidad y manera de distribución de los tricomas. El resultado fue la transferencia de un gran número de especies, desde los cuatro géneros establecidos por Geitler (1932) a 18 nuevas entidades genéricas definidas, que se distribuyeron entre las familias Borziaceae, Pseudanabaenaceae, Schizotrichaceae, Phormidiaceae, Oscillatoriaceae y Gomontiellaceae (ver tabla 1). En particular, estos autores definieron el género *Phormidium* (Anagnostidis y Komárek, 1988, 2005), como aquellas especies que presentan una disposición radial de los tilacoides en las secciones transversales de las células. Además, distinguieron el grupo *Geitlerinema* como subgénero de *Phormidium* y el género *Leptolyngbya* (grupo LPP-B, según Rippka y col., 1979) (Anagnostidis y Komárek, 1988).

Otro género problemático es *Microcoleus* Desmazières 1823 el cual se caracteriza por tener filamentos sin heterocistos que forman agrupaciones delimitados por una vaina común gelatinosa (Geitler, 1932; Castenholz y col., 2001; Anagnostidis y Komárek, 1988, 2005). Igualmente, la morfología del tricoma puede corresponder con distintos géneros del orden Oscillatoriales, creando en ocasiones confusiones a la hora de identificar los individuos. A esto se suma la alteración que sufre la formación de las vainas o incluso la pérdida de las mismas, bajo condiciones de cultivo en laboratorio (García-Pichel y col., 1996).

A pesar de las numerosas revisiones realizadas, se han agrupado algunos organismos muy similares dentro de géneros diferentes, así como, se han separado especies que probablemente estarían estrechamente relacionadas, siendo necesario revisiones drásticas en el futuro.

III. DIVERSIDAD GENÉTICA. TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE CIANOBCATERIAS

Actualmente, los estudios genéticos del ADN juegan un papel esencial en la reconstrucción de las relaciones evolutivas de los organismos permitiendo, por una parte, la confirmación de la taxonomía tradicional o sacando a la luz nuevas

clasificaciones filogenéticas. Se ha incrementado considerablemente la aplicación de técnicas moleculares para amplificar algunas porciones del genoma con el objetivo de caracterizar y deducir las relaciones filogenéticas en cianobacterias, como estudios de biodiversidad. Así, el análisis genético molecular de ADN extraído de hábitats naturales se utiliza hoy en día de forma rutinaria, aplicándose gran cantidad de estrategias para evitar el cultivo selectivo.

Para estudiar la variabilidad de las poblaciones y la diversidad genómica de las especies, se están utilizando una amplia variedad de métodos moleculares que han fijado principalmente como objetivo el empleo de genes funcionales, genes informativos filogenéticamente o genes que han demostrado ser marcadores útiles de la presencia de microorganismos en las muestras. De todos ellos destacan:

- Hibridaciones ADN-ARN y ADN-ADN (Keswani y Whitman, 2001), análisis del porcentaje de G+C de los genomas y comparación del tamaño del genoma (Lachance, 1981; Wilmotte, 1994b; Rippka, 1979).
- La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), que permite de una forma simple y rápida la amplificación de regiones específicas del ADN presente en diferentes muestras biológicas, para su posterior análisis y comparación de secuencias. Estas regiones sirven como marcadores moleculares específicos, para identificar especies y resolver las relaciones filogenéticas entre cianobacterias estrechamente relacionadas. El marcador taxonómico más conocido y utilizado es el gen ARNr 16S al estar presente en todos los organismos vivos (Barker y col., 2000a, b; Lyra y col., 2001; Margheri y col., 2003; Willame y col., 2006). Aunque también se están empleando otros marcadores como: el espacio transcrito interno entre el ARNr 16S y 23S (ITS1) (Laamanen y col., 2002; Taton y col., 2006b), ARNt (Leu) intron (Costa y col., 2002; Rudi y col., 2002) y regiones V6 a V8 del gen ARNr 16S (Rudi y col., 1997), espacio intergénico del operón de la ficocianina (*cpcBA-IGS*) (Robertson y col., 2001; Janson y Granéli, 2002; Berrendero y col., 2008), dinitrogenasa reductasa (*nifH*) (Dyble y col., 2002; Yannarell y col., 2006), D-ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad L (*rbcL*) y proteína X similar a una chaperonina (*rbcX*) (Rudi y col., 1998; Gugger y col., 2002a; Tomitani y col., 2006), subunidad B de ARN polimerasa dependiente ADN (*rpoB*) (Wilson y col., 2000), proteasa tipo serina implicada en la diferenciación del heterocisto (*hetR*) (Schiefer y col., 2002) y el gen que codifica para la proteína A de las vacuolas de gas (*gvpA*) (Hayes y col., 2002; Lyra y col., 2005).

- Para estudiar estructuras complejas de comunidades microbianas y su dinámica se usan las denominadas técnicas de perfiles genéticos o de “fingerprinting”, que proporcionan un patrón o perfil de la diversidad de la comunidad, basándose en la separación física de especies únicas de ácidos nucleicos obtenidos mediante amplificación directa de los ácidos nucleicos del ambiente. Entre estas técnicas destacan: polimorfismo en cadena de hebra simple (SSCP) (Orita y col., 1989), análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA) (Margheri y col., 2003), polimorfismo del tamaño de los fragmentos amplificados (AFLP) (Dvornyk y Nevo 2003), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR) (Teaumroong y col., 2002; Casamatta y col., 2003), polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) (Rasmussen y Svenning, 2001; Widmer y col., 2006) y electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente de temperatura o químico (TGGE y DGGE) (Muyzer, 1999; Zeidner y Béja, 2004). Estas técnicas se pueden utilizar para la comparación de comunidades microbianas de ambientes diferentes o seguir el comportamiento de una comunidad en el tiempo (Borneman y col., 1997). A continuación se explicarán con más detalle los métodos utilizados en la presente memoria.

III.1. Subunidad del ARN ribosómico 16S (ARNr 16S)

Los genes que codifican para los ARN ribosómicos, distribuidos universalmente, presentan un elevado grado de conservación y pueden acumular variabilidades en mayor o menor medida en diferentes regiones de la molécula (Lane y col., 1985). El gen *rrs*, que codifica para la subunidad pequeña de ARN ribosomal (ADNr 16S) ha sido extensamente empleado en estudios filogenéticos bacterianos (Woese, 1987). Este gen junto con los genes *rrl* y *rrf* que codifican para los ARN ribosómicos 23S y 5S respectivamente, se encuentran organizados en un operon (Fig. 2), presente normalmente en múltiples copias en el genoma cianobacteriano (Iteman y col., 2000; Boyer y col., 2001). Se han descrito en algunos taxones la presencia de un único operon, dos operones en *Synechocystis* PCC6803 (Kaneko y col., 1996) y en *Calothrix parietina* (Boyer y col., 2001), 3 operones en *Scytonema hyalinum* (Boyer y col., 2001) y 4 en *Nostoc* PCC7120 (Ligon y col., 1991). Los múltiples operones que aparecen en estos organismos pueden ser copias idénticas (Scheldeman y col., 1999) o bien completamente diferentes en longitud y secuencia debido a las variaciones producidas en las regiones intergénicas (Iteman y col., 2000).

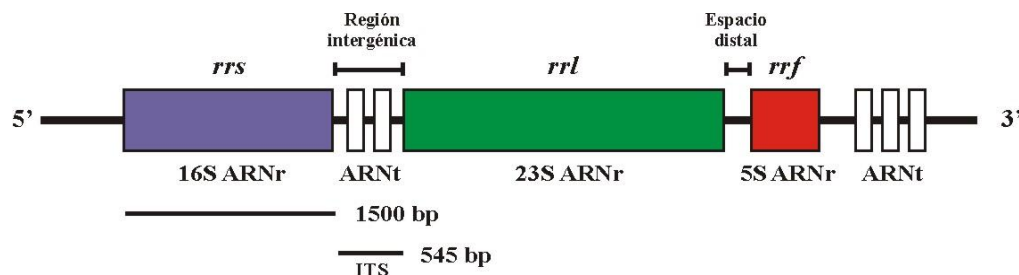


Figura 2. Esquema de la organización genética del operón de los ARN ribosómicos. Se trata de un esquema completo no dibujado a escala. Las líneas negras indican las secuencias no codificantes; las regiones de lectura abierta (de los distintos ARNr y ARNt) se representan con forma de cajas. Abreviaturas: ARNr.- ácido ribonucleico ribosómico. ITS.- espacio interno transcrito, ARNt.- ácido ribonucleico de tranferencia (extraído de Sturion, 2004).

Durante la última década, los investigadores han empleado una gran variedad de técnicas moleculares para responder cuestiones sobre relaciones filogenéticas (Antón y col., 1998; Ishida y col., 2001; Boyer y col., 2002; Janse y col., 2004a; Svenning y col., 2005) y diversidad de poblaciones (Otsuka y col., 1999; Thacker y Paul, 2004). En estos estudios, el análisis del gen ARNr 16S ha jugado un papel muy importante, constituyendo uno de los marcadores taxonómicos más útiles para detectar la presencia de microorganismos, especialmente en muestras naturales. Varios investigadores (Giovannoni y col., 1988; Wilmotte y col., 1992; Nelissen y col., 1996; Turner, 1997) también han empleado el gen que codifica para el ARNr 16S para proporcionar una nueva percepción a las relaciones filogenéticas de los géneros cianobacterianos dentro los órdenes propuestos por Komárek y Anagnostidis (1989).

III.2. Técnicas de perfiles genéticos o “fingerprinting”

A principios de los años noventa comienza la aplicación de los métodos moleculares en los estudios ecológicos, especialmente los basados en la amplificación por PCR de determinados genes, para conseguir un mejor conocimiento sobre las comunidades microbianas del ambiente, independientemente del cultivo de cepas aisladas. De este modo, se han conseguido identificar microorganismos que no pueden ser cultivados con las técnicas de cultivo empleadas hasta ahora. Se estima que sólo el 1% de los microorganismos de la naturaleza se han identificado y cultivado (Amann y col., 1995).

La electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico o TGGE, es una técnica molecular empleada para evaluar la diversidad genética de las comunidades microbianas (Eichner y col., 1999; Brümer y col., 2003; Rodríguez y col., 2007). Este método (ver figura 3) permite la separación de pequeños fragmentos (de un tamaño máximo de 500 bp) de la misma longitud pero de secuencia diferente, según su conformación (Nollau y Wagener, 1997), determinada principalmente por las estructuras secundarias y terciarias de la molécula, que pueden modificarse por influencias externas como temperatura, concentración de sales, pH, etc. De hecho, pueden ser separados fragmentos con la sustitución de una sola base mediante esta técnica (Myers y col., 1985). Generalmente, para evitar la completa desnaturalización de los fragmentos de doble cadena, se añade un fragmento rico en GC (de 23 a 50 nucleótidos) en el extremo 5' del fragmento de ADN amplificado (Myers y col., 1985; Sheffield y col., 1989; Lyautey y col., 2005). Variaciones en la secuencia nucleotídica dentro del dominio con estabilidad térmica menor, causa que las temperaturas de desnaturalización sean diferentes, y moléculas con diferente secuencia pararán su migración en zonas diferentes del gel.

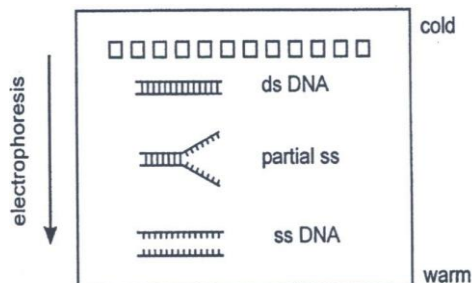


Figura 3. Esquema que muestra el comportamiento de una molécula de ADN durante una electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico (extraído del Manual para TGGE Maxi System de Biometra).

Los diferentes alelos de las muestras amplificadas por PCR mediante cebadores específicos y separados posteriormente por TGGE, dan lugar a un patrón de bandas característico de la comunidad estudiada (ver Fig. 4). Los números, posiciones e intensidades de las bandas obtenidas, pueden ser utilizados para determinar la diversidad de muestras naturales (Muyzer, 1999; Brümmer y col., 2003; Lyautey y col., 2005), seguir el comportamiento de una comunidad en el tiempo y compararlos con los obtenidos para otras muestras de ambientes diferentes (Borneman y Triplett, 1997). La

extracción de cada una de las bandas y su re-amplificación por PCR, permiten además secuenciar e identificar a cada uno de los miembros de la comunidad. Diversos estudios han revelado que las poblaciones bacterianas que forman un 1% o más de total se pueden detectar por TGGE (Muyzer y col. 1993).

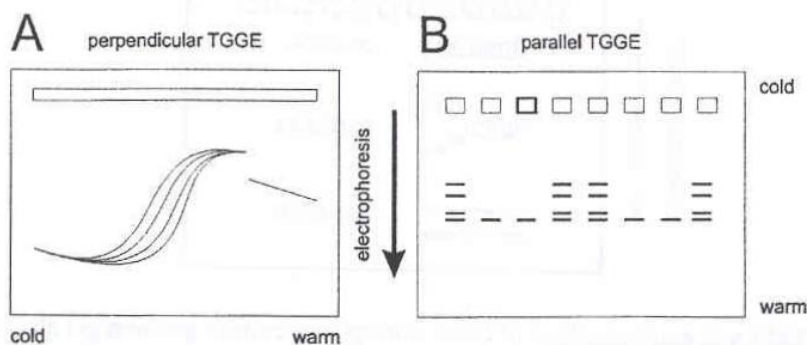


Figura 4. Diagrama del comportamiento de varias especies de ADN durante A: TGGE perpendicular B: TGGE paralela (extraído del Manual para TGGE Maxi System de Biometra).

Actualmente se utiliza esta técnica en estudios de diversidad de cianobacterias en distintos ambientes acuáticos (Dorador y col., 2008; Rajaniemi-Wacklin, 2008), así como, en ambientes más extremos, ya sea de tipo hipersalino (Nübel y col., 2000) o desértico (García-Pichel, 2001).

IV. LA CALIDAD DE LAS AGUAS FLUVIALES

Los ríos han sido fuente de vida y cuna de la civilización, estando asociados a la actividad humana a lo largo de toda la historia. Debido a que las actividades humanas han estado tradicionalmente ligadas a los sistemas fluviales, los ríos se han ido convirtiendo en el medio receptor de los impactos negativos de dicha actividad. La calidad del agua de los ríos es importante intrínsecamente, pero lo es en mayor medida debido a los efectos que dicha calidad tiene sobre los sistemas que dependen e interaccionan con ellos, como las comunidades acuáticas o los ecosistemas de ribera.

Las características físico químicas más importantes desde el punto de vista de la calidad de las aguas son: la conductividad, el oxígeno disuelto, el pH, el contenido en materia orgánica, los denominados nutrientes de nitrógeno (NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+) y de fosfato y los metales pesados (Margalef, 1983; Catalán, 1990). Hay que tener en cuenta que el término “calidad del agua” es algo relativo puesto que cada tipo de río tiene unas características que le confieren una calidad natural, por lo que al realizar estudios de

calidad del agua es necesario tener como referencia la calidad natural de partida para poder definir procesos de contaminación. También es necesario entender que los criterios para valorar la calidad del agua van a variar en función del uso al que se va a destinar.

Los ríos son ecosistemas que permiten la existencia de una gran variedad de organismos, debido principalmente a la gran variedad de microhabitats que pueden formar (Odum, 1972), estando la flora constituida principalmente por fitobentos, macrófitos y fitoplancton (siendo este último escaso en los ecosistemas fluviales con cierta velocidad de corriente) (Margalef, 1983).

El fitobentos, junto al resto de los componentes fotosintéticos de los ecosistemas, juega un papel fundamental en los ecosistemas acuáticos (Lowe, 1979). Están constituidos principalmente por bacilariofitas (diatomeas), clorófitas (algas verdes) y cianobacterias. Los hongos, musgos y hepáticas son muy importantes en ríos pequeños (Haslam, 1978).

Las zonas altas de los ríos se caracterizan por poseer fuertes pendientes y aguas en régimen turbulento, presentan además temperaturas frías y sus aguas suelen ser bastante oligotróficas. Los sustratos por los que circula el agua son generalmente piedras gruesas. Las zonas más bajas sin embargo, están caracterizadas por un flujo de agua más lento, pendientes suaves, aguas por lo general más turbias, debido a la gran cantidad de partículas en suspensión que han adquirido a lo largo de los tramos recorridos, llevando por tanto una mayor carga de todo tipo de constituyentes químicos. Los sustratos suelen ser más finos pues se produce la sedimentación de las partículas en suspensión.

Algunos de los efectos de la contaminación en los ríos son: acidificación, aumento de la turbidez, disminución oxígeno disuelto, aparición de emulsiones, cambios de color, olores (productos volátiles malolientes como ácido sulfhídrico, aminas, ácidos orgánicos, fosfatina y mercaptanos), eutrofización y disminución de la diversidad (Prat, 1991).

El incremento poblacional, la proliferación de la segunda residencia, el incremento de la actividad industrial y la mayor oferta de servicios, generan una mayor demanda de agua, bien escaso, además de causar un deterioro cualitativo. Esto provoca que en la actualidad la mayoría de las aguas corrientes se encuentren en un estado deficiente de calidad debido a la mala gestión y utilización del recurso, siendo el vertido de residuos la causa principal de la degradación de los ecosistemas fluviales.

Existe una amplia normativa en materia de calidad del agua de los ríos (Ley de aguas y reglamentos de desarrollo, Planes de Confederaciones Hidrográficas, etc.), y los estudios de calidad de las aguas fluviales son cada vez más necesarios. La Directiva 2000/60/CE (Comisión Europea, 2000) incidió en la necesidad de que los estudios de calidad del agua no se quedara exclusivamente en el concepto de calidad físico-química, sino que deben introducir con obligatoriedad estudios de calidad biológica, apoyando los estudios de bioindicadores.

V. LA BIOMONITORIZACIÓN

La biomonitorización es el “uso de organismos *in situ* para analizar la calidad de un ecosistema determinado” (Lovett y col., 1994). La finalidad de la biomonitorización es establecer relaciones entre las respuestas de los organismos que habitan en el ecosistema estudiado y la concentración en la que se encuentran los contaminantes que le afectan. Actualmente se utilizan en todo tipo de sistemas.

Existen una gran variedad de métodos de biomonitorización de la calidad del agua en ríos en los que se usan algas, briofitos, plantas superiores, macroinvertebrados y peces (Whitton y Kelly, 1995; Schneider y Melzer, 2003; Schmutz y col., 2007; Borja y col., 2009). Entre las algas, las diatomeas bénticas están siendo muy utilizadas como bioindicadores en muchos países europeos (Whitton, 1991a; Whitton y Rott, 1996; Prygiel y col., 1999; Kelly y col., 2008). También se han desarrollado métodos basados en organismos saprobios (Kolkwitz y Marsson, 1908; Fjerdingsstad, 1964; Sládeček, 1973; Rott y col., 1997), ampliamente utilizados para el análisis de la calidad del agua, los cuales, permiten con cierta precisión determinar las condiciones biológicas de la misma. En España los métodos más utilizados son los índices de macroinvertebrados (BMWP y modificaciones) (Alba-Tercedor y Sánchez Ortega, 1988; Alba-Tercedor y col., 2002; Benito y Puig, 1999) y los de diatomeas (IBD, IPS) (Sabater y col. 1987; Leira y Sabater, 2005).

Estudios recientes han demostrado que, en algunos sistemas fluviales españoles sin incidencia antrópica, los índices de macroinvertebrados y de diatomeas ofrecen valores inferiores a los esperados en función de la calidad físico-química del agua, debido a un efecto tóxico ejercido por las cianobacterias bénticas, dominantes en la comunidad de dichos sistemas fluviales, lo que sugiere la necesidad del desarrollo de metodologías basadas en cianobacterias para realizar correcciones en la biomonitorización de la calidad de las aguas en estos casos (Aboal y col., 2002).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La contaminación de ecosistemas acuáticos, especialmente en ríos, se ha convertido en una materia de gran preocupación durante las últimas décadas debido al incremento de la demanda de agua para uso público, tanto por la industria, como por la producción agropecuaria y los servicios. Ahora bien, estas actividades no sólo suponen un consumo de agua (bien escaso en nuestro país), sino que también generan vertidos que contribuyen a la degradación de los ecosistemas acuáticos.

Por otra parte, el progresivo desarrollo de la actividad humana está teniendo un marcado impacto en la naturaleza, provocando, entre otras cosas, una creciente pérdida de biodiversidad en todo tipo de ecosistemas terrestres y acuáticos. Los ecosistemas fluviales no escapan a este problema, pudiéndose observar en ellos una progresiva degradación de las comunidades biológicas y una alarmante disminución de la calidad del agua (Sabater y col., 2009). Así, cobran especial importancia los estudios de seguimiento y calidad de los ecosistemas fluviales con el fin de vigilarlos, conservarlos y/o recuperarlos. Para conseguir ese objetivo es fundamental el desarrollo de metodologías de evaluación de la calidad de las aguas (monitorización). En esta línea, la implementación de la Directiva Marco sobre el agua (Directiva 2000/60/CE), supone cambios importantes debido a la mayor importancia que se da a la calidad del agua y su valor ambiental, exigiendo un mayor esfuerzo respecto al control integrado y prevención de la contaminación. La novedad más significativa es la introducción del concepto de estado ecológico de las aguas, abandonando los criterios de valoración de éstas basados exclusivamente en parámetros físico-químicos, para buscar otros más amplios que midan el estado de salud de los ecosistemas en su conjunto. A este respecto es fundamental la incorporación de parámetros biológicos para evaluar el estado ecológico de las aguas (Ariño Ortiz y Sastre Beceiro, 1999) en el marco denominado biomonitorización.

Las cianobacterias, al encontrarse en la base de las cadenas tróficas experimentan los efectos negativos de la contaminación antes que otros organismos, y ello hace que puedan tener un “efecto onda” en los niveles tróficos superiores, por lo que se les puede considerar como indicadores relevantes en el campo de la evaluación medioambiental (Kelly y Whitton, 1998; Whitton, 1999).

Tradicionalmente los trabajos acerca de cianobacterias bénticas fluviales han formado parte de estudios genéricos de toda la flora algal (Margalef, 1952, 1953; Aboal,

1989; Sabater y col., 1990). Las cianobacterias bénticas constituyen una comunidad bien desarrollada y forma parte importante del bentos de ríos. Sin embargo, los estudios sobre biodiversidad y ecología de las cianobacterias en los sistemas fluviales son relativamente escasos (Rott y Pfister, 1988; Cantonati y col., 1996), sobre todo si los comparamos con los realizados en otros ecosistemas acuáticos como lagos y embalses, donde actualmente están adquiriendo gran importancia, sobre todo por problemas de toxicidad (Aboal, 1988; Oliver y Ganf, 2000; Sanchis y col., 2002; Carrasco, 2007).

En estudios previos acerca de la diversidad de cianobacterias en sistemas fluviales (Perona y col., 2003; Serrano y col., 2004) y su relación con la calidad de las aguas (Fernández-Piñas y col., 1991; Perona y col., 1999) se han encontrado cambios en la composición de la comunidad de cianobacterias en respuesta a procesos de contaminación (Perona y col., 1998; Douterelo y col., 2004; Perona y Mateo, 2006). Por otra parte, se han llevado a cabo experimentos de laboratorio en cepas aisladas, que mostraban una respuesta diferencial frente a condiciones limitantes de nutrientes (Mateo y col., 2006). Asimismo se han realizado en distintos tipos de ríos experimentos fisiológicos *in situ* en los que se ha determinado la actividad fosfatasa en cianobacterias dominantes en dichos ríos, en relación con condiciones limitantes de fósforo, presentando una relación inversa con las concentraciones de dicho nutriente en el agua, siendo propuesta dicha actividad como una medida complementaria en estudios de biomonitorización (Mateo y col., 2010).

Estos estudios se han basado en la caracterización de la comunidad de cianobacterias bénticas mediante el análisis de la riqueza específica y el análisis de la abundancia en localizaciones con distinta calidad del agua, para poder buscar relaciones con las variaciones en ésta. Estudios muy recientes han aportado un nuevo índice basado en algas bentónicas (no incluye diatomeas) para evaluar el estado trófico de los ríos nórdicos (Schneider y Lindstrøm, 2011) donde se aporta un listado amplio de cianobacterias con distintas exigencias ecológicas.

Los estudios de riqueza específica de cianobacterias precisan de la identificación taxonómica de las especies, lo cual entraña dificultades debido a su variabilidad morfológica, grado de polimorfismo y variación geográfica (Komàrek y col., 1991, Baker, 1991, 1992) así como lo controvertido de su taxonomía. La caracterización e identificación de especies de cianobacterias es un proceso complicado y lento, que en ocasiones la única forma de realizarla es a través de cultivos, comparándolos con el material vivo. Sin embargo, las especies en cultivo desarrollan frecuentemente estados

anómalos cuyas características morfológicas difieren de las especies naturales (Komàrek y Anagnostidis, 1999). Algunos estudios han caracterizado las diferencias existentes entre algunas especies en cultivo y en la naturaleza (Perona y col., 2003; Berrendero y col., 2008, 2011; Mateo y col., 2011).

Así, distintos autores encuentran necesario la realización de estudios desde nuevos enfoques que incluyan nuevos estudios morfológicos, citológicos, fisiológicos, ultraestructurales, bioquímicos y moleculares (Whitton, 1992, Komàrek, y Anagnostidis, 1999, 2005). Debido al problema que existe en la identificación taxonómica, son necesarias otras técnicas complementarias que aporten más información a la hora del estudio de las cianobacterias, y dinamicen el proceso. Por lo tanto, la finalidad de este proyecto es dar un paso más dentro de este ámbito, y ofrecer una posible herramienta que ayude al trabajo de identificación y caracterización de las especies bioindicadoras, así como el desarrollo de metodologías que permitan de una manera rápida detectar cambios en la calidad de las aguas fluviales.

Como se comentaba anteriormente, la aplicación de técnicas moleculares se ha incrementado notablemente en los últimos años. Así, distintos grupos de investigación están llevando a cabo estudios polifásicos, en los que se estudia la diversidad de cianobacterias desde una aproximación combinada, morfológica y genética, y en algunos casos también ecofisiológica, (Palinska y Marquardt, 2008; Zapomělová y col., 2008, 2009; Cuzman y col., 2010; Heath y col., 2010).

Por otra parte se ha comprobado que la diversidad molecular de los microorganismos analizada *in situ* es mayor que la encontrada mediante los análisis microscópicos tradicionales, o las técnicas dependientes de cultivo (Ward y col., 1990; Amann y col., 1995; Ward y col., 1998). La ecología molecular microbiana también ha experimentado un gran auge en las últimas décadas, aplicándose gran cantidad de estrategias para evitar el cultivo selectivo; (Díez y col., 2001; Dorigo y col., 2005; Malik y col., 2008; McMahon y col., 2008). Así mismo, las técnicas de “fingerprinting”, principalmente DGGE y TGGE, se están utilizando para la comparación de comunidades microbianas de ambientes diferentes o seguir el comportamiento de una comunidad en el tiempo (Borneman y Triplett. 1997; Muyzer 1999; Grossman y col., 2010; Villaescusa y col., 2010). En estudios previos preliminares realizados en el río Guadarrama se ha encontrado una reducción en la diversidad de cianobacterias en un gradiente de eutrofización aguas abajo mediante la

aplicación de la técnica TGGE (Rodríguez y col., 2007), resultados puntuales que tienen su continuidad en el presente estudio.

De esta manera, el objetivo general de este estudio ha sido el análisis de la biodiversidad de cianobacterias de biofilms de ríos en relación con la calidad de las aguas, desde un triple abordaje:

- (1) **Caracterización morfológica** de poblaciones bentónicas y de cepas aisladas de cianobacterias procedentes de distintos puntos de muestreo de ríos con distintos niveles de contaminación.
- (2) **Caracterización genética** de las mismas relacionándola con la morfológica y analizando las relaciones filogenéticas de los genotipos encontrados.
- (3) **Caracterización ecofisiológica**: analizar el efecto de distintas concentraciones de nutrientes sobre el crecimiento de las cepas aisladas y en experimentos de competencia entre varias cepas.

Asimismo, el estudio de dicha biodiversidad en ríos y diferentes localidades con distinta calidad de aguas mediante una aproximación independiente de cultivo nos llevó a un cuarto objetivo:

- (4) **Analizar los cambios y /o variabilidad en la biodiversidad de cianobacterias** en el río Guadarrama (Madrid) por medio de electroforesis en gel desnaturante por gradiente térmico (TGGE), con el fin de su posible futuro uso en biomonitorización.

Consideramos que el uso combinado de técnicas clásicas, especialmente técnicas morfológicas y fisiológicas, con técnicas moleculares, permitirá un mejor y más completo análisis de poblaciones de cianobacterias en los ecosistemas fluviales, contribuyendo a un mayor conocimiento de su biodiversidad y de las características fisiológicas que influyen en su distribución, así como al análisis del impacto de diferentes factores sobre estas comunidades. Asimismo, la caracterización de las especies desde este triple abordaje podrá ser de gran utilidad en el esclarecimiento de la taxonomía de ciertos grupos con especial problemática sistemática, así como en el establecimiento de relaciones filogenéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.1. Río Manzanares

Nace a unos 2.160 m de altitud en la vertiente meridional de la sierra de Guadarrama, localizándose en el Parque Regional de la Cuenca Alta del Manzanares (coordenadas geográficas 40°46'N 3°55'O). Es el tercer afluente del río Jarama por su margen derecha. El punto de muestreo elegido se sitúa en la zona alta del río, cerca de Cantochochino (Fig. 6). Al estar enmarcado en un espacio protegido, los usos que se pueden llevar a cabo son limitados. El tramo del río se caracteriza por presentar aguas claras, con un lecho rocoso, formado por rocas y gravas, de materiales predominantemente silíceos.

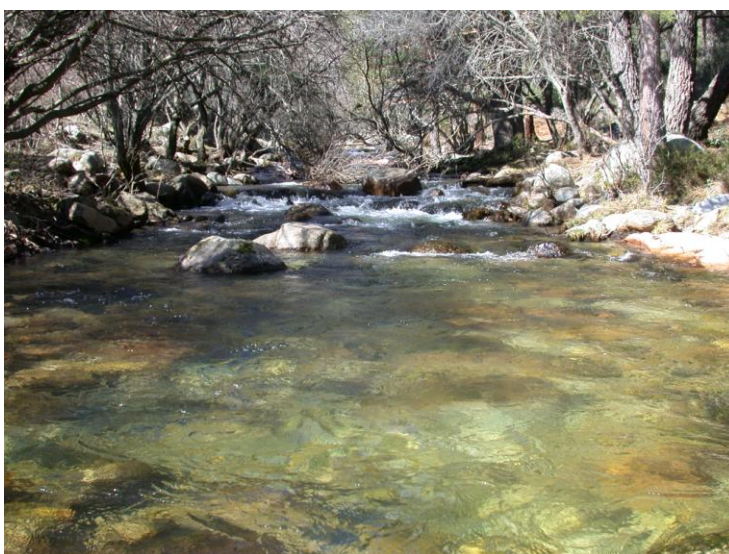


Figura 6. Aspecto general del río Manzanares en el punto de muestreo.

El río Manzanares se caracteriza por la alternancia de rápidos y remansos y un caudal afectado por el deshielo primaveral y el estiaje veraniego, típico de un sistema montañoso y de clima mediterráneo. En este punto el cauce se encajona entre formaciones rocosas de grandes proporciones, labrando sobre la piedra numerosas pozas y hoyas. La vegetación es escasa en su nacimiento debido a la alta montaña, pero en cotas menores aparecen abedules, sauces y chopos.

I.2. Río Guadalix

Nace a 1.790 m de altitud en el puerto de la Morcuera (municipio de Rascafría) y desemboca a 600 m de altitud en el río Jarama, tras haber recorrido 41.2 Km de longitud hasta desembocar en el río Jarama. Durante gran parte de su recorrido discurre sobre sustratos silíceos típicos del noroeste de la comunidad de Madrid, aunque también

cruza los afloramientos calizos desde El Vellón y San Agustín de Guadalix, los que le confiere cierto grado calcáreo a sus aguas en el tramo final. Las aguas de este sistema fluvial se encuentran reguladas por el embalse de Miraflores de la Sierra ubicado a una cota de 1.298 m, y por el embalse del Vellón a 830 m de altitud. Los principales caudales se registran en los meses de mayo y junio llegando a $1 \text{ m}^3/\text{s}$ cuando se produce el deshielo, mientras que en el resto del año no se sobrepasan los $0.6 \text{ m}^3/\text{s}$. La temperatura media anual registrada oscila entre $10\text{-}16^\circ\text{C}$, con precipitaciones medias anuales entre 400-800 mm.

Se distinguieron dos zonas de muestreo denominadas GLX1 y GLX3 (Fig. 7). El punto GLX1 se encuentra próximo a la cabecera a unos 1.500 m de altitud, cerca del municipio de Bustarviejo (coordenadas $40^\circ50'\text{N}$ $3^\circ45'\text{O}$). En este tramo del río las aguas son claras y rápidas con alguna proximidad a fincas dedicadas a ganadería extensiva. Se trata de una zona granítica, por lo que las aguas presentan un carácter ligeramente ácido. La anchura aproximada del cauce en este punto es de 3-4 m y el caudal es abundante.



Figura 7. Aspecto de los puntos de muestreo del río Guadalix: punto GLX1 (A) y punto GLX3 (B).

El punto GLX3 se sitúa próximo a la desembocadura del río Guadalix en el río Jarama y está situado junto a un polígono industrial en San Agustín de Guadalix (coordenadas $40^\circ42'\text{N}$ $3^\circ35'\text{O}$). Además, sus aguas son ligeramente más básicas que las del punto anterior puesto que el río ya ha atravesado los afloramientos calizos citados

anteriormente. La anchura del cauce es de 5-6 m y su caudal, al igual que en GLX1, depende de las diferentes estaciones climatológicas.

I.3. Arroyo Mediano

El Arroyo Mediano es un arroyo de montaña (Fig. 8) situado en su totalidad en el Parque Regional de la Cuenca Alta del Manzanares. Nace en un manantial a 1970 m de altitud (coordenadas 40°47'N 3°50'O), en la Sierra de Cuerda Larga (Sierra de Guadarrama) y desemboca en el embalse de Manzanares el Real (894 m) tras 11 Kms. de recorrido. El clima se corresponde con el clima mediterráneo, caracterizado por presentar una alternancia estacional: veranos con temperaturas altas y tiempo seco e inviernos con un descenso suave de temperaturas, donde tienen lugar la mayor parte de las precipitaciones; aunque debido a la continentalidad, las temperaturas invernales se endurecen y los veranos son muy calurosos. El lecho del arroyo es rocoso, formado por rocas y gravas, de materiales predominantemente silíceos (Serrano y col., 2004).

El arroyo Mediano posee todas las características típicas de un sistema montañoso y de clima mediterráneo, con alternancia de rápidos y remansos y un caudal afectado por el deshielo primaveral y el estiaje veraniego. La vegetación es bastante rica y se encuentra relativamente bien conservada, donde se encuentran abedules y pastizales de berceo, pinares y bosques de enebro, encina y matorral de brezo, junto con fresnos y melojos. En cuanto a la vegetación de ribera se encuentra distribuida de forma discontinua a lo largo del cauce, estando constituida por sauces, majuelos, nogales, fresnos y zarzas (Serrano y col., 2004).



Figura 8. Aspecto general del arroyo Mediano en el punto de muestreo.

I.4. Río Guadarrama

El Río Guadarrama nace en el Valle de la Fuenfría, al pie de Siete Picos (coordenadas 40°47'N 4°02'O). Desde allí recorre 145 Km. hasta abandonar la Comunidad de Madrid en Batres, desembocando en el Tajo por su margen derecha, ya en tierras de Toledo. Su curso medio se encuentra protegido dentro del Parque Regional del Curso Medio del río Guadarrama y su entorno. La cuenca abarca 1708 Km² y sus recursos hídricos medios se calculan en 152 Hm³/año. Se trata de un río con marcado carácter silíceo puesto que todos los materiales por los que discurre son de este tipo. En las zonas de cabecera, el río se encaja en los materiales paleozoicos de tipo metamórfico, fundamentalmente gneíses y granitos de esta zona de la Sierra de Guadarrama, formando un valle a medida que se adentra en los materiales arcóscos del periodo terciario. Todo el curso medio-bajo de este río se asienta sobre el denominado acuífero Madrid-Toledo-Cáceres siendo fuente de recarga para este acuífero en numerosos puntos. El régimen pluviométrico varía en función de la zona, desde los 856 mm anuales en Villalba hasta los 226 mm en su salida de la Comunidad de Madrid. Los suelos de la cuenca del Guadarrama son por norma general de tipo tierras pardas sobre materiales silíceos y suelos pardos no calizos. La vegetación, típicamente mediterránea, está compuesta en su mayor parte por encinares, que se combinan con el bosque de ribera formado por fresnos, sauces, chopos y olmos. En general se trata de un río poco regulado si se compara con otros como el Lozoya, destacando en la cuenca sólo el embalse de Valmayor en el río Aulencia, principal afluente del Guadarrama.

El río Guadarrama está catalogado por el Ministerio de Medio Ambiente como un río de aguas eutrofizadas (Confederación Hidrográfica del Tajo, 1999), debiéndose la contaminación fundamentalmente a las actividades humanas que se desarrollan en la cuenca, siendo la principal de ellas los propios asentamientos (por vertidos directos, situación cada vez menos frecuente, o por vertido de depuradoras).

Se determinaron tres puntos de muestreo en el río Guadarrama (Fig. 5). El primer punto de muestreo, denominado **GU1**, se encuentra en la cabecera de la cuenca del Río Guadarrama (coordenadas 40°41'N 4°05'O), un arroyo de montaña a la altura del Valle de Los Caídos, el Guatel Segundo, afluente directo del río Guadarrama que parece no estar afectado por ningún tipo de vertido. En la figura 9 se puede ver el aspecto del punto GU1. Se caracteriza por ser un río con poca anchura y poca profundidad, de aguas claras y de sustrato rocoso de carácter silíceo formado fundamentalmente por gneíses. En el punto de muestreo alterna una zona con baja

velocidad del agua y otra zona de rápidos. La vegetación arbórea es densa y proyecta sombras sobre el agua. El epilíton bien visible de color verde intenso.



Figura 9. Aspecto del punto de muestreo GU1.

El segundo punto de muestreo, **GU2**, situado a 22 Km. de distancia de río del punto anterior, se encuentra en el término municipal de Galapagar, al pie del puerto del mismo nombre en la Zona Recreativa “El Retamar” (coordenadas 40°32’N 3°56’O). El punto se encuentra en la confluencia del río con la carretera M-505 Las Rozas - El Escorial en el Pk5. En este punto de muestreo el río ha recibido vertidos de depuradoras de algunos municipios, así como vertidos no controlados de urbanizaciones residenciales apostadas en las cercanías del río. Además ha podido recibir vertidos accidentales de los polígonos industriales de Villalba. La figura 10 ilustra el aspecto del punto GU2.



Figura 10. Aspecto del punto de muestreo GU2.

El cauce es ancho y de aguas claras, presentando una llanura de inundación amplia. Presenta dos zonas diferenciadas, una de aguas con velocidad baja y sustrato arenoso y otra zona de corriente rápida de baja profundidad con sustrato arenoso-rocoso y presencia abundante de piedras (de carácter silíceo, abundando gneises, granitos y cuarcitas). La vegetación de ribera es menos densa por que la iluminación del agua es mayor que en el caso anterior. Las piedras presentan epilíton bien desarrollado de color marronáceo.

El tercer punto de muestreo, **GU3**, a 16 Km. del punto anterior está situado en el término municipal de Boadilla del Monte a la altura del Pk. 11.5 de la carretera M-509 Pozuelo – Brunete a la entrada de la urbanización *La Raya del Palancar* (coordenadas 40°25'N 3°56'O). En este punto del río ha recibido el aporte de los vertidos de otras dos depuradoras, y con posibles vertidos de polígonos industriales. Este punto de muestreo se muestra en la figura 11. El cauce es bastante ancho, y la llanura de inundación es muy amplia debido a la topografía llana.



Figura 11. Aspecto del punto de muestreo GU3.

El agua presenta una elevada turbidez y a veces no se ve el fondo. Es el punto de caudal más abundante y la velocidad de la corriente es alta. El sustrato es fundamentalmente arenoso, siendo difícil la búsqueda de piedras que suelen ser de tipo conglomerado con escaso desarrollo del epilíton. La vegetación de ribera es densa, con abundante presencia de juncos. En cada punto, se analizaron los parámetros físico-químicos del agua, bien *in situ* bien en muestra recogida, así como la comunidad epilítica de cianobacterias sobre las piedras del lecho del río.

II. RECOGIDA DE MUESTRAS

Las campañas de muestreo del río Guadarrama se llevaron a cabo durante el año 2006-2007 en las distintas estaciones climatológicas con las siguientes fechas: 28 de noviembre de 2006 (otoño), 13 de marzo de 2007 (invierno), 6 de junio de 2007 (primavera) y 18 de julio de 2007 (verano). Los muestreos correspondientes a la recogida de tapetes para el estudio diversidad de cianobacterias pertenecientes al género *Phormidium* y *Oscillatoria*, se realizaron el 7 de julio de 2009 en el río Guadarrama, y en los ríos Guadalix, Manzanares y arroyo Mediano se llevaron a cabo en noviembre de 2009.

Para la realización de los análisis se recogieron dos tipos de muestras: agua para el análisis químico y piedras para la extracción del bentos para el análisis biológico. Además se realizaron *in situ* algunas medidas de parámetros físico-químicos según se describe más adelante.

Las muestras de agua se recogieron en botes de polietileno de boca ancha de 1 l y con cierre hermético, en la parte media del cauce con el fin de tomar muestras representativas, evitando sobre todo zonas remansadas. Todo el material necesario para la toma de muestras de agua (portafiltros, jeringas, botes de polietileno, etc.) fue lavado previamente con HCl al 10% y aclarado tres veces con agua destilada para eliminar restos de fosfatos de los detergentes que pudieran inducir a errores en la medida de este parámetro.

La recogida del agua se realizó enjuagando los recipientes con el agua del río y llenándolos a contracorriente de forma que el agua no entrase de forma turbulenta para evitar la formación de burbujas de aire, cuyo contenido en oxígeno modificaría el estado químico de los distintos parámetros que se iban a medir con posterioridad (APHA, 1980).

En segundo lugar, para el análisis biológico en el estudio estacional del río Guadarrama, se recogieron tres piedras del lecho del río y tapetes cuando se encontraron en cada punto de muestreo. Las piedras se escogieron en función de los siguientes criterios: que estuvieran en zonas cubiertas por agua, con tapiz epilítico visible, sin macrofitos, con tamaño suficiente (de entre 4 y 5 cm de diámetro mínimo) para poder realizar posteriormente el raspado del epilíton, y con una composición mineral adecuada que permita la extracción del epilíton sin que se disgregue la piedra. Las piedras se conservaron en frío hasta su procesado.

Los tapetes de cianobacterias encontrados en la superficie de piedras cubiertas por agua o en sedimentos en las orillas del río, se recogieron con la ayuda de un bisturí. Las muestras se transportaron en botes de polietileno y se mantuvieron en nevera a 4°C, y ya en el laboratorio, se separaron en alícuotas para los distintos análisis biológicos. Las muestras destinadas para el estudio morfológico se fijaron en formol al 4% y se mantuvieron a 4°C, y el resto de alícuotas se guardaron a -20°C para la caracterización genética.

III. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL AGUA

III.1. ANÁLISIS *IN SITU*

Sobre el propio río se llevó a cabo la determinación de los siguientes parámetros físico-químicos:

- **Temperatura del agua y O₂ disuelto.** Las medidas se realizaron con un oxímetro portátil WTW (Wissenschaftliche Technische Werkstetten, Weilheim, Germany) OXI 196 con una sonda EOS 196, con ajuste automático de presión y temperatura para su calibrado. Se anotó la medida de oxígeno en % saturación como en mg/l, y en °C para la temperatura. Además, se midió en cada estación la temperatura ambiente con un termómetro de mercurio.
- **pH.** Se midió con un pH-metro portátil WTW modelo pH-96, con un electrodo de vidrio con sonda de ajuste de temperatura modelo SenTix41, previamente calibrado.
- **Conductividad.** Se midió con un conductivímetro portátil Crison CDTM-523 (Barcelona, España) en µS/cm.
- **Caudal.** Se calculó a partir de la medición del caudal parcial de transectos de 1m de longitud. Para ello fue necesario tomar medidas de anchura del cauce y de velocidad y profundidad del cauce:

Anchura del cauce. Se midió con una cinta métrica flexible.

Velocidad del agua y profundidad del cauce. Se midió con un fluómetro portátil Global Water Flor Probe modelo FP 101-201, medido en m/s.

Con dichas medidas, se pudo calcular el caudal parcial utilizando la siguiente fórmula:

$$Q_i = [(V_1 + V_2) / 2] * [(D_1 + D_2) / 2] * b$$

Donde:

- Q_i = caudal en m^3/s de cada transecto.
- V_1 = velocidad media en m/s registrada por el fluómetro en el punto 1 de cada transecto.
- V_2 = velocidad media en m/s registrada por el fluómetro en el punto 2 de cada transecto.
- D_1 = profundidad en metros medida en el punto 1 de cada transecto.
- D_2 = profundidad en metros medida en el punto de cada transecto.
- b = anchura en metros de cada transecto.

El caudal total del río se calcula como el sumatorio de los caudales de todos los transectos.

Todos estos parámetros fueron medidos *in situ* por las características intrínsecas de algunas de ellas y por la premura de medida que requieren otra, para no sufrir modificaciones.

III.2. DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS DEL AGUA

El análisis químico de las muestras de agua se llevó a cabo empleando un laboratorio portátil DREL-2010 de HACH, siguiendo los protocolos descritos en el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1980). Se midieron los siguientes parámetros: $[NH_4^+]$, $[NO_3^-]$, $[NO_2^-]$, $[SO_4^{2-}]$, $[PO_4^{3-}]$, $[Ca^{2+}]$.

Previamente al comienzo de las mediciones, el agua recogida en el campo se filtró con filtros de fibra de vidrio GF/C Whatman (Whatman International Maidstone, UK) de 25 mm de diámetro y de un tamaño de poro de 0.8 μm , con el fin de eliminar los sedimentos y sólidos en suspensión que pueda contener el agua. Una vez filtrada el agua, se continuó con la determinación de las sustancias químicas ya indicadas, las cuales se explican a continuación:

Determinación del amonio: se llevó a cabo con el método *Nessler*. El reactivo *Nessler* (yodomercurito potásico alcalino) en presencia de iones amonio se descompone, formando iones de diyodomercurioamónio, compuesto coloreado que permite hacer una determinación colorimétrica (en función de la intensidad del color amarillo que adquiere el compuesto) midiendo la absorbancia a 425 nm. Este protocolo utiliza también para el análisis un estabilizador mineral y alcohol polivinilo, agente dispersante que facilita la reacción. El rango de detección de este método es de 0.1 a 2.5 mg/l de $N-NH_4^+$.

Determinación de los nitritos: se empleó el método de diazotización usando el reactivo *Nitraver 3*. En este método el nitrito reacciona con ácido sulfanílico dando lugar a una sal intermedia de diazonio, que reacciona con ácido cromotrópico para formar un complejo de color rosado cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de nitrito. La determinación se realizó midiendo la absorbancia a 507 nm. El rango de detección es de 0.01 a 0.3 mg/l de N-NO_2^- .

Determinación de los nitratos: se utilizó el método de reducción con cadmio usando el reactivo *Nitraver 5*. Los nitratos de la muestra son reducidos por el cadmio metálico a nitritos que, en medio ácido, reacciona con ácido sulfanílico para formar una sal intermediaria de diazonio, que reacciona a su vez con ácido gentísico para formar un producto de color ámbar, cuya intensidad es proporcional a la concentración de ión nitrato. La determinación se realizó midiendo la absorbancia a 500 nm. El rango de detección de este método es 0.5-30 mg/l de ión nitrato (método de alto rango). En los casos en que la concentración de nitratos resultó inferior al límite de detección, se utilizó el método de bajo rango, cuyo reactivo es *Nitraver 6* el cual oxida los nitratos a nitritos, tras lo que se realizó una determinación normal de nitritos. El rango de detección de este método es de 0-0.4 mg/l de N-NO_3^- .

Determinación de ortofosfatos: con este método se midió el ortofosfato reactivo soluble o el fósforo reactivo soluble de ortofosfato (PRS) con el reactivo *Phosver 3*. El ortofosfato reacciona con un molibdato en medio ácido formando un complejo de fosfomolibdato que es reducido por ácido ascórbico produciendo un compuesto de color azul cuya intensidad es proporcional a la concentración de ortofosfato. La determinación se realizó midiendo la absorbancia a 890 nm. El rango de detección de este método es de 0.01 a 2.5 mg/l de P-PO_4^{3-} .

Determinación de la dureza debida al calcio: se trata de una valoración en la que el reactivo indicador *Calver 2*, en medio alcalinizado con KOH 8N, se acompleja con los cationes divalentes de calcio dando lugar a un compuesto de color violeta. Después se realiza la valoración añadiendo EDTA 0.08 M. El EDTA reacciona con los cationes divalentes de calcio combinados con el indicador, provocando un cambio de color (de violeta a azul). El volumen de EDTA añadido se calculó con ayuda de un tritador digital especial de HACH. Los dígitos del tritador digital representan los mg/l de Ca^{2+} medidos como CaCO_3 . El rango de detección es 10-100 mg/l de CaCO_3 .

IV. ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD EPILÍTICA

IV.1. TÉCNICAS DE CULTIVO DE CIANOBACTERIAS

IV.1.1. Medios de cultivo

Existen numerosos medios utilizados para el aislamiento y cultivo de cianobacterias. Los medios de cultivo utilizados se describen a continuación:

Unos de los medios fue el *medio Chu No. 10D* (Chu 1942) modificado, en el que se ha reducido la concentración de fósforo (Gómez y col., 2009). Este medio bajo en nutrientes es muy útil para dilucidar los rasgos morfológicos, citológicos y fisiológicos propios de ciertas poblaciones que viven en medios oligotróficos. Su composición en sales se muestra en la tabla 4. El medio se ajustó a pH 7.6 con tampón HEPES 2.5 mM.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo Chu No. 10D modificado (Gómez y col., 2009).

Componentes	Concentración
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.032 mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.101 mM
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ *	0.250 mM
$NaHCO_3$	0.188 mM
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.009 mM
Na_2 -EDTA	0.010 mM
Microelementos:	
H_3BO_3	11.56 μ M
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.229 μ M
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.193 μ M
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.028 μ M
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.079 μ M
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0.037 μ M

*Para medio sin nitrógeno, se reemplaza este componente por $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a una concentración de 0.25 mM.

El medio BG11 (Rippka y col., 1979) posee concentraciones de nitrato muy altas y de fósforo en menor medida. En el caso del medio BG11₀ (sin nitrógeno combinado) se empleó con el fin de favorecer el crecimiento de cianobacterias fijadoras de N₂ atmosférico. La composición química de este medio se muestra detallada en la tabla 5. Ambos medios se tamponaron con HEPES 2.5mM y se ajustaron a pH 7.8.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo BG11 (Rippka y col., 1979).

Componentes	Concentración
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.18 mM
Na ₂ -EDTA	0.003 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.25 mM
NaNO ₃ *	17.65 mM
Ácido cítrico	0.029 mM
Citrato férrico amónico	0.020 mM
Na ₂ CO ₃	0.19 mM
Microelementos:	
H ₃ BO ₃	46 µM
MnCl ₂ · 4H ₂ O	9.1 µM
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.77 µM
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.60 µM
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.32 µM
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0.17 µM

* Para el medio BG11₀ (sin nitrógeno combinado) se desestima este componente.

El medio Allen y Arnon (Allen y Arnon 1955), modificado por Hu y colaboradores (1982), contiene altas concentraciones de sales y de nitrógeno combinado y muy altas de fósforo. Este medio está diseñado para obtener altos rendimientos celulares. La composición y concentración de sales se muestran en la tabla 6.

Todas las soluciones se prepararon y esterilizaron por separado y fueron almacenadas a 4 °C en nevera. Una vez preparados los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave automático modelo HA240M/300M de Sulzer España, a 1.5 Kg/cm² de presión durante 20 min a 121 °C.

Para la preparación de medios de cultivo sólido en placas de Petri, se utilizó el medio de cultivo líquido y se combinó con agar purificado al 1.5 %. El medio y el agar se autoclavaron por separado para evitar la formación de toxinas (Rippka, 1988a) (121°C, 20 min el medio líquido y 110°C y 15 min el agar).

Tabla 6. Composición del medio Allen & Arnon modificado (Hu y col., 1982).

Componentes	Concentración
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	2 mM
NaCl	4 mM
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	1 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.5 mM
Na ₂ -EDTA	76.75 µM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	69.16 µM
NaNO ₃ *	6.25 mM
KNO ₃ *	6.25 mM
Microelementos:	
H ₃ BO ₃	46 µM
MoO ₃	1.25 µM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9.1 µM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.77 µM
NH ₄ NO ₃	0.196 µM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.32 µM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.17 µM

* En el caso del medio sin nitrógeno, se desestiman estos componentes.

En el cultivo de las muestras de epilíton, se añadió además el antibiótico cicloheximida con una concentración final en el medio de 0.1g/l en los diferentes medios de cultivo. De esta manera, se impide el crecimiento de hongos, levaduras y algas verdes, lo que facilita el crecimiento de las cianobacterias y su posible aislamiento.

IV.1.2. Condiciones de cultivo y siembra

Para la preparación de los cultivos (aislados previamente) empleados en los diferentes ensayos de laboratorio, se crecieron en un agitador orbital CH-4103 Bottminger con una velocidad constante de 150 rpm, en un incubador a una temperatura constante de 18°C y en condiciones de fotoperiodo, con el siguiente ciclo de luz y temperaturas: 16h de luz, con una intensidad de luz constante de 20 $\mu\text{moles de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, y 8h de oscuridad. El objetivo es que las condiciones se asemejen, lo más posibles, a las del medio natural. Se mantuvieron en fase logarítmica mediante resiembras periódicas en medio fresco para evitar su envejecimiento y muerte. La siembra de los cultivos tuvo lugar en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar Captair 2005-HPS que había sido previamente irradiada con luz ultravioleta (U.V) durante 10 minutos.

Además de los cultivos en medio líquido, se hicieron resiembras de las cepas en medios agarizados siguiendo el método descrito por Rippka (1988b) con el fin de obtener un stock permanente de cada una de ellas. Con ayuda de una lupa binocular, se recogió un único filamento o parte de la colonia dependiendo del tipo de cianobacteria. El inóculo se sembró en una placa de agar al 1.5% de medio del que procedía y se mantuvieron en el incubador en las mismas condiciones descritas anteriormente.

IV.2. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE CIANOBACTERIAS

IV.2.1. Aislamiento de cianobacterias del epilíton

El epilíton, constituido por las comunidades bióticas localizadas en la superficie de las piedras, se recogió tomando 3 piedras del lecho del río en cada punto de muestreo. Para la extracción del epilíton de las piedras recogidas, se seleccionó un área de 16 cm^2 de la superficie rocosa que se raspó suavemente con ayuda de un cepillo de cerdas no muy duras (para que el roce no resulte excesivamente agresivo). El epilíton extraído se resuspendió en 10 ml de medio líquido BG11₀ (libre de nitrógeno). Todo el material utilizado en este punto debe ser previamente lavado con etanol, para eliminar contaminaciones sobre la muestra, y aclarado después con abundante agua destilada.

Este extracto de epilíton se utilizó para los distintos análisis biológicos y la siembra en placas Petri con distintos medios de cultivo. La siembra se llevó a cabo inoculando 0.3 ml del extracto en las placas Petri con distintos medios de cultivo. Las placas se colocaron en un cultivador de placas (luz, 20-50 $\mu\text{moles de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, y temperatura, 25-28°C). El cultivador está provisto de una serie de bandejas de

metacrilato en donde las placas son colocadas y unos fluorescentes laterales que proporcionan aproximadamente la misma intensidad de luz a todas ellas. Los ventiladores laterales actúan reciclando el aire de la cámara, manteniendo mejor la temperatura.

IV.2.2. Aislamiento de cepas a partir de colonias de cianobacterias

Una vez que las placas han sido sembradas, se mantuvieron en el cultivador durante 3 o 4 semanas hasta conseguir un crecimiento adecuado de las cianobacterias. Se realizó un seguimiento de las placas para que las colonias no llegasen a solaparse demasiado. El tiempo de cultivo fue variable en función de la piedra y del medio de cultivo empleado.

Pasado ese tiempo, se procedió al aislamiento de las cepas siguiendo el método descrito por Rippka (1988b), extrayéndose muestras de las colonias con un capilar muy fino fabricado a partir de una pipeta Pasteur. Con ayuda de una lupa binocular, se recogió (a poder ser) un único filamento de la colonia, que se sembró en una placa de agar al 1.5% y en el mismo medio del que procedía. Se mantuvieron en el cultivador hasta su crecimiento y se repitió el procedimiento hasta conseguir colonias monoclonales de las estirpes.

Una vez conseguido el aislamiento, se procedió a resembrar las cianobacterias en matraces Erlenmeyer de 50 ml que contenían medio de cultivo líquido. Cuando dicha especie comenzó a crecer, se puso en agitación para conseguir así mayor volumen de cultivo, necesario para los experimentos de caracterización genética y fisiológica. Todo el material utilizado para este proceso fue previamente lavado con HCl y esterilizado para evitar posibles contaminaciones que entorpecieran el proceso de aislamiento.

IV.3. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CIANOBACTERIAS

IV.3.1. Microscopía óptica

El análisis morfológico se llevó a cabo mediante observación macroscópica y microscópica de las muestras. Para el análisis macroscópico de las colonias crecidas en placas se empleó una lupa binocular con fuente de luz fría serie SZ 45 (Leica, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). El análisis microscópico se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico Olympus BH2-RFCA (Olympus, Tokio, Japón) equipado con contraste de fases, epifluorescencia y un sistema de cámara de video (Leica DC Camera,

Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y en un microscopio Olympus BX61 (Olympus, Hamburg, Germany) equipado con una cámara DP70 CCD.

Se emplearon las siguientes características tradicionales para identificar a las cianobacterias estudiadas: morfología de la colonia, longitud y anchura de las células vegetativas, ausencia o presencia de vaina, longitud y disposición de los tricomas en las colonias, heterocistos y acinetos y forma del filamento.

Todas las cianobacterias empleadas en este estudio se clasificaron utilizando las claves dicotómicas de Geitler (1930-1932) y Desikachary (1959) principalmente, actualizando dichas determinaciones taxonómicas con las revisiones que han realizado Anagnostidis y Komarek (1988, 1990), Komarek y Anagnostidis (1989, 1999, 2005), Hoffmann (1988b) y Whitton (2002).

IV.3.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para el estudio de la ultraestructura celular de algunas muestras, tanto de campo como de cianobacterias aisladas, se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión. Las muestras fueron tratadas según el protocolo de Ascaso y Rapsch (1985). Para fijar las muestras se utilizaron una serie de soluciones: tampón Sorensen ($\text{NaHPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.1M, pH 7.2), solución de Fijación (tampón Sorensen con glutaraldehído al 3.1 %), solución de Postfijación (tampón Sorensen con OsO_4 al 1%) y solución de Agar (tampón Sorensen con agar purificado al 2%). Se recogieron 30 ml de cultivo y se lavaron con 10 ml de tampón Sorensen tres veces sucesivas, se centrifugaron 10 min a 10000 rpm en cada ocasión. Para hacer más fácil el manejo de las muestras se realiza una inclusión en agar. Así, tras el último lavado se resuspendió el sedimento con una gota de tampón Sorensen y una gota de agar a 40-50°C en un tubo Eppendorf y se fragmentaron en cubos de aproximadamente 1mm de tamaño de arista.

A continuación se llevaron las muestras al Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid para el tratamiento final que consistió en procesos de fijación, postfijación, deshidratación e inclusión en resinas, y finalmente, la realización de los cortes. Los cortes fueron de tipo ultrafinos contrastados con metales pesados (uranilo y plomo). Las muestras fueron observadas con el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM1010 y fotografiadas con la cámara BioScan de Gatan y sistema de análisis de imagen (DigitalMicrograph 3.1).

IV.4. TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA: BIOENSAYOS CON ESPECIES DE CIANOBACTERIAS

IV.4.1. Ensayos de competencia en sustrato artificial

Después del estudio de poblaciones de cianobacterias realizados con las muestras de epilíton fijadas de cada punto de muestreo y sembradas en placas con diferentes medios de cultivo, se seleccionaron aquellas especies cuya presencia y/o abundancias aumentaban en un punto concreto del río. Se escogieron, por tanto, 9 especies potencialmente bioindicadoras y se les sometió a un estudio de competencia entre especies.

Para ello, se rellenaron dos placas Petri (de 40 ml de volumen) hasta la mitad con agar al 2%. Después, se inoculó en cada placa una muestra de colonia (aislada previamente) representativa de cada especie a estudiar. Por último, se añadieron 5 ml de medio *Allen y Arnon* (AAN) en una placa, y en la otra se añadió la misma cantidad pero del medio *Chu No. 10D* (CHU₁₀D) modificado. Todo se realizó bajo condiciones de esterilidad en campana. Se dejaron reposar en el incubador (ASL IBERCEX) 24 horas para permitir que los inóculos se fijasen al sustrato, en las mismas las condiciones descritas en el apartado IV.1.2. Una vez transcurrido el tiempo, se puso en agitación en un agitador orbital (Orbitek XL Infors).

De esta manera, se intentó reproducir las condiciones que más se aproximan a las de la propia naturaleza, simulando la actividad turbulenta del río sobre las especies fijadas en un sustrato, en este caso el agar. Cada 10 días se hizo un seguimiento del crecimiento de las especies, observando tanto su abundancia como su morfología.

La abundancia relativa se estimó mediante una lupa binocular Leica MZ 7.5 con fuente de luz fría de 6.3 a 50 aumentos. Con ayuda de un papel milimetrado se calculó la superficie ocupada por cada una de las especies. En cuanto al estudio de la morfología, se tomaron fotografías tanto de la colonia (con una cámara digital Nikon Coolpix 995 acoplada en la lupa), como a nivel celular mediante muestras al microscopio con una cámara Leica DC 300F acoplada al mismo. Todo esto se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Además, se sometieron las placas a aportes de nutrientes cada 10 días añadiendo la misma cantidad de 5 ml de medio correspondiente en cada una.

IV.4.2. Gradiente de nutrientes

Una vez seleccionadas las especies potencialmente bioindicadoras, se les sometió a tres experimentos que consistieron en una gradación de diferentes concentraciones de los nutrientes derivados del nitrógeno (NH_4^+ y NO_3^-), y del fósforo (PO_4^{3-}).

El rango de concentraciones elegido fue el mismo para todos los nutrientes, el cual se define a continuación: 0.2, 3, 6, 10, 50 y 100 mg L^{-1} . Se seleccionaron las concentraciones según los valores de nutrientes encontrados tanto en el medio natural como en los medios de cultivo utilizados en el laboratorio para el asilamiento de las cianobacterias. El medio utilizado para los ensayos fue CHU_{10} D (Tabla 4) libre en P o N dependiendo del caso y se añadió el componente específico en el medio para cada uno de los nutrientes de estudio (Tabla 7). En los bioensayos de fosfato en donde la concentración final era de 0.2 mg L^{-1} , se reemplazó el K añadiendo KCl en la proporción adecuada según el medio de cultivo.

Tabla 7. Diseño de los bioensayos y las concentraciones específicas de P y N en el medio de cultivo utilizadas.

Componente	Nutriente	Concentración FINAL (mg L^{-1})					
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	NO_3^-	0.2	3	6	10	50	100
	P (mg L^{-1})	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
	N (mg L^{-1})	0.04	0.7	1.3	2.3	11.2	22.5
	N:P	0.07	1.1	2.2	3.8	19	38
NH_4Cl	NH_4^+	0.2	3	6	10	50	100
	P (mg L^{-1})	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
	N (mg L^{-1})	0.2	2.3	4.5	7.8	39	78
	N:P	0.2	4	8	13	65	130
K_2HPO_4	PO_4^{3-}	0.2	3	6	10	50	100
	P (mg L^{-1})	0.06	0.8	1.7	2.8	14	28
	N (mg L^{-1})	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
	N:P	120	8	4	2.5	0.5	0.2

Para este experimento se usó una placa multipocillos marca IWAKI (Microplate, P-24) de poliestireno. Cada pocillo tiene un volumen de 2 ml y un diámetro de 16 mm. Cada placa presenta 4 filas de 6 pocillos cada una, usando para cada tipo de nutriente un

total de dos placas, es decir, 8 filas de seis pocillos. Cada fila representa el gradiente de concentración de nutrientes (de 0.2 a 100 mg L⁻¹) según se explicó anteriormente. Para la realización de estos experimentos se utilizaron cuatro especies distintas de cianobacterias, agrupadas en parejas, según su potencial bioindicador. El estudio se realizó en cada pareja, tanto para cada especie individual como para una mezcla de ambas, en triplicado. Un esquema del experimento se puede observar en la figura 12.

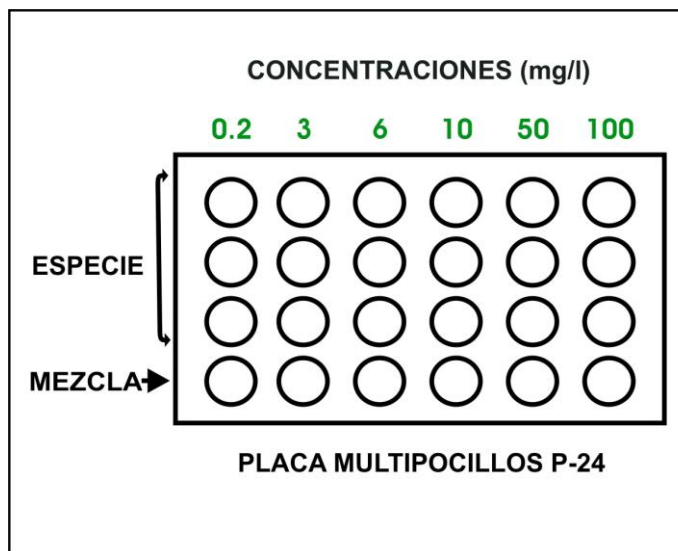


Figura 12. Representación de una placa multipocillos P-24 donde se muestra la distribución de las especies (elaboración propia).

Para realizar estos experimentos se necesitaron inóculos muy homogéneos de cada especie a estudiar a partir de los cultivos aislados con anterioridad. Para la preparación del inóculo se filtró con embudos y filtros (0.45 µm) estériles una cantidad de cultivo aislado. Los filtros se lavaron tres veces con el medio específico para cada experimento. Se metieron en un matraz estéril de 25 ml y se echó el medio requerido. Después, se centrifugó el contenido en tubos Eppendorf y se desmenuzó el pellet con un palillo homogeneizador o también en tubos de ensayo con un homogeneizador Potter con varilla de teflón, de POBEL. Así, se obtuvo un cultivo homogéneo con el fin de inocular la misma cantidad en cada uno de los pocillos. En el caso de no ser suficiente con este mecanismo, se utilizó un aparato sonicador (Selecta) y se mantuvo durante 3-4 minutos el matraz dentro del mismo. Así se obtuvieron finalmente inóculos de igual densidad. Las medidas de densidad óptica se llevaron a cabo mediante el espectrofotómetro SHIMADZU MultiSpec-1501. Previamente al inicio del experimento, los cultivos fueron crecidos durante 4 días en medio libre de N y P con el fin de eliminar las reservas de los respectivos nutrientes en las células.

Se inocularon 100 µl de cultivo homogeneizado de la especie seleccionada, en los casos individuales, y en los casos mezcla se inocularon 100 µl de cada una de las especies. Ya completado el procedimiento, se cerraron las placas con parafilm y se conservaron en el incubador en agitación durante 20 días, en las mismas condiciones descritas previamente. Por último, para estimar la biomasa inicial, se recogió la misma cantidad de inóculo de cada especie en tubos de ensayo, se fijaron con dos gotas de formol, y se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta su recuento.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la estimación del crecimiento de la biomasa de los distintos ensayos. Para este cometido se contaron las muestras extraídas de cada pocillo (previamente fijadas con formol al 4%), por triplicado, mediante el uso de una cámara Neubäuer (Brand, Alemania) en el microscopio Olympus BH2. El número de células por volumen se calculó según las medidas del portaobjetos indicado y teniendo en cuenta el factor dilución, superficie ocupada y la altura del mismo.

IV.5. TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CIANOBACTERIAS

IV.5.1. Aislamiento de ADN genómico de cianobacterias

La extracción de ADN genómico se realizó según el protocolo de Porteus y colaboradores (1997) adaptado previamente para la extracción en muestras de epilíton. Se tomaron 1.5 ml de cada extracto de epilíton y se centrifugaron a 13.000 rpm en (centrífuga refrigerada Sigma 202 MK) a temperatura ambiente durante 8 minutos. Tras descartar el sobrenadante se añadieron 900 µl de tampón de lisis (0.25 M NaCl, 0.1M Na₂EDTA, 4 % SDS) previamente precalentado a 60°C. La muestra se congeló en N₂ líquido y seguidamente, se homogeneizó con un homogenizador BOSCH CSB-850-2RET. Tras repetir la operación tres veces, se añadieron 75 µl de isotiocinato de guanidina 5 M. Se agitó en agitatuos VELP Scientifica durante 60 segundos y se sonicó durante 2 minutos. Posteriormente se incubó durante 1 hora a 68 °C y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.

A continuación, se guardaron 600 µl de sobrenadante en un tubo de 2 ml limpio y se añadieron 75 µl de acetato potásico 5 M y 250 µl de PEG 8000 al 40 % y 10 µg de glucógeno. Se dejó precipitar durante al menos una hora a -20 °C y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El precipitado fue disuelto en 900 µl de CTAB 2x (2% bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 1.4 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA). Se sonicó

la muestra durante 1 minuto y se incubó 15 minutos a 68 °C. Seguidamente, se añadieron 900 µl de cloroformo mezclando suavemente y se centrifugó a 13000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. El ADN acuoso se precipitó con 1 ml de isopropanol durante al menos 15 minutos a -20 °C tras lo que se centrifugó la muestra a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El precipitado fue disuelto en 450 µl de acetato amónico 2.5 M y se añadió 1 ml de etanol al 95 %. La muestra se dejó precipitar durante al menos 15 minutos a -20 °C y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, se resuspendió el precipitado en 450 µl de TAE 1X (0.04 M Tris acetato pH 8, 0.001 M Na₂EDTA).

Para lograr mayor eficiencia en la amplificación del ADN, se procedió a la purificación y concentración de la extracción añadiendo los 450 µl resultantes de la extracción a una columna Microcon-100 de Amicon (Beverly, MA, EE.UU). Para ello se realizaron dos lavados con TAE 1X y uno con agua destilada, tras lo cual se invirtió la columna, recuperando el volumen que permanecía en ella con el ADN limpio. Finalmente, los ácidos nucleicos se resolvieron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0,8% sumergidos en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM pH 7,6, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) (Sambrook y col., 1989). Las muestras se mezclaron con el tampón de carga (Glicerol 60% (p/v) en TAE con Bromofenol 0,25% (p/v)). El gel se tiñó con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron bajo radiación ultravioleta en un transiluminador (Gel Doc 1000, BioRad). El tamaño de los fragmentos se estimó por su movilidad electroforética usando como referencia la escalera de 1 Kb Gene Ruler de MBL Biotools. El material se mantuvo a -20 °C hasta el momento de su análisis.

IV.5.2. Determinación del gen ARNr 16S en cianobacterias mediante PCR

Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S

La determinación de la secuencia del gen ARNr 16S en los diferentes cultivos se llevó a cabo mediante el aislamiento de ADN genómico, amplificación de dicha región por PCR y posterior secuenciación directa de los fragmentos amplificados. El nombre, la secuencia y el sitio de unión de todos los cebadores empleados para amplificar el gen que codifica para el ARNr 16S de las cianobacterias analizadas en este estudio se muestran en la tabla 8. Todos cebadores fueron sintetizados comercialmente por Roche (Roche Applied Science, Alemania).

Para amplificar los genes de ARNr 16S de las cianobacterias aisladas en este estudio, se emplearon el siguiente conjunto de oligonucleótidos iniciadores: 16S27F

(Wilmotte y col., 1993) y 16SPLG2.1R (Urbach y col., 1992), Por otro lado, para la amplificación de los tapetes de poblaciones del medio natural se recurrió a la clonación de los productos amplificados en vectores de expresión utilizando los cebadores 16S27F y el 23S30R (Lépere y col., 2000). La amplificación se llevó a cabo con un termociclador (Perkim Elmer Gene Amp PCR System 2400) según Gkelis y col., 2005: 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de: 94 °C/ 45 segundos, 57 °C/ 45 s y 68 °C/ 2 min, y una extensión final a 68 °C/ 7 min. Se preparó una mezcla de reacción que contenía: 2,5 µl de Buffer de PCR 10X, MgCl₂ 1,5 mM, 50 µM de cada deosinucleótido trifosfato, 10 pmol de cada cebador, suero de albúmina bovina (BSA) 1 mg.ml⁻¹, 5 µl TaqMaster™ PCR Enhancer 5x (Eppendorf, Alemania), 0,75 U Ultratools DNA polimerasa (Biotools, España), agua mili-Q estéril y 10 ng de ADN molde para un volumen final de reacción de 25 µl. Los fragmentos amplificados se resolvieron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1.5%, utilizando como patrón un marcador de peso molecular 1 Kb Gene Ruler de MBL Biotools. Finalmente, los productos amplificados se purificaron con Real Clean Spin Kit (Real, Durviz, s.l.u., España) siguiendo las recomendaciones del fabricante para ser secuenciados.

Tabla 8. Oligonucleótidos iniciadores empleados en este estudio para amplificar el gen ARNr 16S.

Oligonucleótido ^a	Secuencia (5' → 3')	Sitio de Unión ^b	Referencia
16S359F	GGGGAATYTTCCGCAATGGG ^c	359-378	Nübel y col., 1997
16S781R(a)	GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT	781-805	Nübel y col., 1997
16S781R(b)	GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT	781-805	Nübel y col., 1997
16S27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	7 - 27	Wilmotte y col., 1993
16SPLG2.1R	GTACGGCTACCTTGTTACGAC	1494-1514	Urbach y col., 1992
23S30R	CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT	30-52	Lépere y col., 2000

^a R (3' → 5') y F (5' → 3'), designaciones empleadas para expresar la orientación de los cebadores en relación al ARNr.

^b posición con respecto a la secuencia nucleotídica del ADNr 16S o 23S de *E. coli*.

^c Y indica una degeneración nucleotídica C/T.

Secuenciación

Se realizó una secuenciación automática de ambas hebras de ADN mediante el sistema ABI Pris (Applied Biosystems) de terminadores fluorescentes Big Dye™ y el instrumento de electroforesis multicapilar ABI 3730, en el Servicio de Secuenciación de ADN del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid). Los

oligonucleótidos empleados fueron los mismos que para la amplificación por PCR de la región estudiada.

El proceso de búsqueda de similitud entre las secuencias obtenidas y las de las bases de datos, se llevó a cabo mediante el programa BLASTN del National Center for Biotechnology Information (NCBI) componente de U.S. National Institute of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se procesaron todas las secuencias generadas para corregir los errores producidos durante la secuenciación a través del programa informático BioEdit versión 5.0.9. (Hall, 1999). Finalmente, se compararon las secuencias con las publicadas en diferentes bases de datos mediante el programa BLASTN del NCBI, y el Servicio WU-BLAST del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk/blast2/index.html>).

IV.5.3. Clonación de los fragmentos amplificados del gen ARNr 16S

Los fragmentos amplificados de las muestras naturales se ligaron a un vector y con él se transformaron células de la bacteria *Escherichia coli* estirpe DH5- α MC1022 (Φ 80 Δ lacZ Δ M15, *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*) U169). El vector empleado es el plásmido de alto número de copia pGEM^R-T del sistema pGEM^R-T Easy Vector Systems (3015 bp) de Promega, que contiene el gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Este vector presenta los promotores de RNA polimerasa T7 y SP6 flanqueando a un región de clonación múltiple con varios sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción dentro de la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*).

El proceso de ligación se realizó según las recomendaciones del fabricante, presentes en el manual de instrucciones de cada sistema empleado.

Medios de cultivo empleado para E.coli

Para el cultivo de las cepas de *E. coli* se utilizó el medio LB (medio lisogénico) para bacterias (Bertani, 1951), al que se añadió 1.5% (p/v) de agar para su crecimiento en medio sólido, medio al que se denomina LA (medio lisogénico con agar). La composición de cada uno de ellos se describe en la tabla 9. Las soluciones se esterilizaron en un autoclave automático HA240M/300M Sulzer España, S.A. a 1.5 Kg/cm² de presión, durante 20 minutos a 121°C, si el medio no contenía agar, o 15 minutos a 115°C, si llevaba agar.

Para el crecimiento de cultivos de bacterias (tanto en medio sólido como en medio líquido) se añadió una cierta cantidad de antibiótico, en este caso ampicilina a una concentración final de $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

Tabla 9. Medios de cultivo utilizados para el cultivo de *E. coli*. (Bertani, G., 1951).

Solución	Componentes	Cantidad añadida
MEDIO LB	Extracto de levadura (0.5% p/v)	5 g.l ⁻¹
	Tryptona (1% p/v)	10 g.l ⁻¹
	NaCl (0.5% p/v)	5 g.l ⁻¹
MEDIO LA	Igual composición que en el medio LB más agar bacteriológico (1.5 % p/v)	15 g.l ⁻¹

Preparación de bacterias competentes

Las células competentes de *E. coli* DH5- α MC1022 se prepararon químicamente por el método de cloruro cálcico (Mandel e Higa, 1970), modificado posteriormente por Hanahan en 1983 para usar iones bivalentes. Las células de una colonia aislada de *E. coli* se inocularon en 3 ml de medio LB líquido y se mantuvieron a 37 °C en agitación constante 250 rpm en un incubador Innova™ 4000 (New Brunswick Scientific) durante una noche. A continuación, se inocularon 200 ml de medio LB líquido con 1 ml del cultivo crecido durante una noche. El cultivo se mantuvo en agitación a 37°C hasta alcanzar una absorbancia de 0.4-0.5 medida a 600 nm (aproximadamente 2 horas). A partir de este momento, tanto el cultivo como el material utilizado durante el proceso se mantuvieron en hielo.

Se centrifugó el cultivo a 3.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Después de descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió suavemente en 20 ml de solución TFB I, cuya composición química se describe a continuación: acetato potásico 30 mM pH 5.8, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, RbCl₂ 100 mM y glicerol 15%. Transcurridos 10 minutos de incubación en hielo, el cultivo se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 10 minutos y posteriormente, se resuspendió el sedimento en 4 ml de solución TFB II. La composición química de la solución TFB II es la siguiente: MOPS 10 mM pH 7, CaCl₂ 75 mM, RbCl₂ 10 mM y glicerol 15%. Finalmente, las células competentes se repartieron en alícuotas de 200 μl en tubos Eppendorf y rápidamente guardadas a -80°C.

Transformación

Para transformar células de *E. coli* con el plásmido, se añadieron 10 µl de mezcla de ligación (plásmido con el inserto de interés) a una alícuota de 200 µl de células competentes de *E. coli* DH5α (Sambrook y col., 1989). Se incubó esta mezcla en hielo durante 20 minutos, para permitir que las moléculas de ADN entren en contacto con las células competentes y poder así pasar a su interior. Las células se sometieron a un choque térmico, que consistía en una incubación a 42 °C sin agitación durante 2 minutos, seguida de una incubación en hielo durante 10 minutos. Seguidamente, se añadieron 0,9 ml de medio LB líquido y se mantuvieron en agitación a 250 rpm durante una hora a 37 °C en un incubador InnovaTM 4000 (New Brunswick Scientific).

Después del periodo de incubación, 100 µl de la mezcla de transformación se añadieron a una placa de medio LB sólido con X-Gal y el antibiótico adecuado. El resto de la mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 30 segundos a temperatura ambiente. Se desechó la mayor parte del sobrenadante, dejando la cantidad suficiente que nos permitiera resuspender el sedimento y añadirlo a otra placa de manera similar a la anterior. Ambas placas se incubaron durante toda la noche en una estufa a 37 °C.

Obtención del fragmento clonado del gen ARNr 16S

Para comprobar que el plásmido contiene el fragmento de interés, se empleó la técnica de PCR. De este modo, se inocularon las células de una sola colonia de *E. coli* DH5α con ayuda de palillos estériles y se añadieron en 25 µl de mezcla de reacción. A continuación, se realizó una PCR con los mismos cebadores utilizados inicialmente para la obtención del fragmento de interés modificando las condiciones descritas en el apartado IV.5.2: 94 °C durante 20 minutos, seguido de 20 ciclos de: 94 °C/ 45 s, 57 °C/ 45 s y 68 °C/ 2 min, y una extensión final a 68 °C/ 7 min. Los fragmentos amplificados se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, y se purificaron para la secuenciación conforme se describe en el apartado IV.5.2. El tamaño de los fragmentos amplificados fue verificado en un gel de agarosa al 1,5 %. Finalmente, se purificaron los productos amplificados con Real Clean Spin Kit (Real, Durviz, s.l.u., España) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se secuenciaron.

IV.5.4. Estudios de biodiversidad de cianobacterias mediante el análisis del ARNr 16S

Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S

La amplificación del gen ARNr 16S de cianobacterias fue realizada de manera empleando el siguiente conjunto de oligonucleótidos iniciadores: CYA359 (Nübel y col., 1997) con una secuencia de 23 nucleótidos rica en GC (CCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCC) en su extremo 5' necesaria para separar los fragmentos amplificados por TGGE, y 16S781Ra y 16S781Rb (Tabla 8), sintetizados comercialmente (Roche Applied Science, España). Las condiciones de la PCR se describen de la siguiente manera: 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de: 94 °C/ 1 min, 60 °C/ 1 min y 72 °C/ 1 min, y una extensión final a 72 °C, que se amplió a 20 minutos para prevenir la formación de artefactos que se pueden producir durante el proceso (Janse y col., 2004). Se preparó una mezcla de reacción que contenía: 2,5 µl de Buffer de PCR 10X, MgCl₂ 1,5 mM, 50 µM de cada deosinucleótido trifosfato, 10 pmol de cada cebador, suero de albúmina bovina (BSA) 1 mg.ml⁻¹, 5 µl TaqMasterTM PCR Enhancer 5x (Eppendorf, Alemania), 0,75 U Ultratools DNA polimerasa (Biotools, España), agua mili-Q estéril y 10 ng de ADN molde para un volumen final de reacción de 25 µl. La cuantificación de los fragmentos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1.5%, utilizando como patrón un marcador de peso molecular 1 Kb Gene Ruler de MBL Biotools.

Utilización de TGGE en la separación de los amplicones del gen ARNr 16S

Los fragmentos amplificados por PCR de las distintas cianobacterias se resolvieron por electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico, según las especificaciones del fabricante.

Para la preparación del gel se disolvieron en agua destilada 32,46 g de urea (concentración final 8M), 1,59 ml de glicerol al 85%, 1,35 ml de Buffer TAE 50x, 8,4375 ml de acrilamida/bis-acrilamida [40% (29:1)] (BioRad Laboratories) y 13,5 ml de formamida desionizada para alcanzar una concentración final del 20%. Finalmente, se añadieron a la solución, previamente esterilizada con filtros de acetato de celulosa filtros (0,2 µm), 160 µl de persulfato amónico al 10% (Sigma, Sigma-Aldrich) y 85 µl de TEMED (Fluka, Sigma-Aldrich) para la polimerización del gel. Las muestras se mezclaron con el tampón de carga (Triton-X 100 0,1%, azul de bromofenol 0,01% (p/v) y EDTA 2mM disueltos en buffer TAE). La electroforesis se realizó a 130 V durante 16

horas en el sistema TGGE Maxi (Biometra, Alemania) bajo un gradiente de temperatura de 38.5 °C a 49 °C.

La visualización de las bandas se llevó a cabo mediante la tinción de los geles de poliacrilamida con nitrato de plata siguiendo el método descrito por Sanguinetti, y col. (1994). Para ello las muestras se fijaron con una solución de ácido acético glacial 0,5% (v/v) y etanol 10% (v/v) durante 3 minutos antes de teñir los geles de poliacrilamida con una solución de nitrato de plata al 0,2% (p/v) durante aproximadamente media hora. A continuación, se lavaron los geles dos veces con agua destilada (el primer lavado de 10 segundos y el segundo de 5 segundos). Posteriormente, se incubó el gel en solución de revelado (hidróxido sódico 3% y formaldehído 0,5%) hasta la visualización de las bandas (aproximadamente 5 min). Después de la tinción, los geles se incubaron en solución fijadora durante 5 min y lavados con agua mili-Q durante 10 min con el fin de mantener un registro permanente del experimento. Finalmente, los geles se colocaron en una placa de cristal cubiertos con papel transparente y se dejaron secar al menos durante 24 h. Los geles se fotografiaron con una cámara digital marca Nikon coolpix 995.

Recuperación de los amplicones de los geles de poliacrilamida.

Las bandas de interés obtenidas mediante TGGE se seleccionaron y se escindieron del gel de poliacrilamida con la ayuda de una lámina de bisturí quirúrgico esterilizada. Estas bandas se incubaron en 100 µl de una solución de Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM y Triton® X-100 0,1% pH 9 a 95°C durante 20 min. Después de centrifugar las muestras durante 1 min a 13000 rpm, se reamplificó 1 µl del ADN eluído de cada banda de TGGE siguiendo las condiciones ya descritas en el apartado IV.5.4., utilizando los oligonucleótidos CYA359F sin la secuencia rica en GC en el extremo 5', necesario sólo para separar los fragmentos amplificados en TGGE y 16S781Ra o 16S781Rb (Tabla 8). Los fragmentos amplificados por PCR se resolvieron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1,5%. Finalmente, se purificaron los productos amplificados con Real Clean Spin Kit (Real, Durviz, s.l.u., España) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se secuenciaron.

IV.5.5. Procesamiento y análisis filogenético de las secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas se procesaron para eliminar errores producidos durante la secuenciación y las posibles contaminaciones, como segmentos de secuencia del vector empleado para clonar algunas de las secuencias obtenidas. Posteriormente, se compararon las secuencias con las depositadas en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando la herramienta de Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST) (Altschul y col., 1990). Mediante este programa podemos visualizar la similitud que presenta nuestra secuencia con otras especies de cianobacterias.

Durante la amplificación por PCR y secuenciación se pueden introducir a veces artefactos. Los errores comunes que se podrían producir son la formación de quimeras, una pobre secuenciación o un pobre ensamblaje de las secuencias. Las anomalías no detectadas pueden conllevar a la formación de árboles filogenéticos, que nos proporcionan una falsa impresión de la diversidad de las especies y una confusa clasificación e identificación de las mismas. Para identificar de forma simultánea las secuencias anómalas del gen ARNr 16S, se empleó el programa Mallard versión 1.02 (Ashelford, 2006) (disponible en www.cardiff.ac.uk/biosi/research/biosoft).

Posteriormente, se procedió al alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas, con otras seleccionadas de las bases de datos mediante el programa Clustal W 1.4 (Thompson y col., 1994). El ajuste de los extremos de las secuencias de ADN, se realizó con la ayuda del programa GenDoc versión 2.6.002 (Nicholas y col. 1997). Los árboles filogenéticos se generaron por el método de neighbour-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) usando la matriz de Tajima y Nei (1984) para calcular la distancia evolutiva.

Para comprobar la validez de este análisis, se construyeron árboles filogenéticos adicionales por maximum-parsimony (MP) y maximum-likelihood (ML). Los árboles filogenéticos de NJ y MP se obtuvieron con el programa MEGA versión 4 (Tamura y col, 2007) y el árbol de ML mediante el servidor PhylML 3.0 (Chun y col., 2007) accesible en <http://atgc.lirmm.fr/phymml/>. El cálculo de la significación estadística de las similitudes entre las secuencias se obtuvo mediante el test de bootstrap de Felsenstein (1985) para 1000 replicas. Los árboles filogenéticos constan de las secuencias determinadas en este estudio junto con secuencias de especies relacionadas, que han sido seleccionadas de las bases de datos utilizando el programa BLAST.

IV.6. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

IV.6.1. ANÁLISIS DE LOS EXPERIMENTOS ECOFISIOLÓGICOS DE COMPETENCIA

Los valores de crecimiento bajo distintas concentraciones de nutrientes fueron analizados mediante el programa SigmaPlot 9.0 y con el programa estadístico SigmaStat integrado. Para determinar la existencia o no de diferencias significativas en el crecimiento de cada cianobacteria, se empleó un análisis de la varianza aplicando un ANOVA (Test Student-Newman-Keuls).

IV.6.2. ANÁLISIS DIGITAL DE LOS GELES DE TGGE

Los geles fueron fotografiados digitalmente y analizados mediante el programa Quantity One de Bio-Rad Lab. (Hercules, CA, EE.UU). Después de la eliminación del ruido de fondo, las bandas fueron detectadas y estandarizadas mediante el método del disco rodante con el patrón de referencia incluido, de acuerdo a las instrucciones del programa utilizado. Cada banda fue descrita en función de su posición estandarizada y su intensidad relativa, medida como la superficie relativa del pico de la banda, dividida entre la suma de las superficies de todos los picos en el perfil.

Los datos obtenidos de abundancias y posiciones relativas fueron utilizados para realizar, por un lado, el análisis de correspondencia (CA) con el fin de poder representar las relaciones entre los distintos perfiles en dos dimensiones. El CA está bien adaptado a los datos de abundancias, dado que se basa en un modelo que asume una distribución unimodal de las especies a lo largo de los gradientes ambientales (Ter Braak, 1985; Legendre y Legendre, 1998). En segundo lugar, se realizó un análisis de correspondencias canónicas (CCA) el cual proporciona una estimación de los efectos de las variables ambientales sobre las comunidades biológicas. Permite por tanto, identificar gradientes ambientales, y en concreto, determinar cuáles de las variables ambientales son relevantes en la composición de las comunidades (Ter Braak, 1986). El soporte estadístico se realizó mediante el Test de Montecarlo. Ambos análisis se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico CANOCO (Ter Braak, 1991), versión 4.5.

Posteriormente, con el fin de estimar el efecto global de los distintos tratamientos, los datos fueron también utilizados para realizar agrupamientos jerárquicos aglomerativos (HAC), empleando en este caso, el índice de distancias de Jaccard. Principalmente está destinado para la agrupación de los datos de presencia-ausencia y

abundancia de especies, calculando distancias de Jaccard entre las columnas de un 0-1 de la matriz. La distancia de Jaccard entre dos especies es de $1 - (\text{número de regiones en las que ambas especies están presentes})/(\text{número de regiones en las que al menos una especie está presente})$. Los agrupamientos se realizaron con el método de agrupamiento pareado no ponderado utilizando la media aritmética (UPGMA, Sneath y Sokal, 1973), basado en las medias de las disimilitudes chi-cuadrado entre los tratamientos. Para calcular los agrupamientos significativos en los dendogramas, se aplicó el algoritmo de K-Means (McQueen, 1967) para una correcta configuración de los distintos “cluster” o agrupamientos gracias al paquete estadístico XLSTAT. Finalmente, los dendogramas se determinaron automáticamente mediante R (entorno de software libre para la estadística y computación gráfica; versión 2.11.1) con el paquete *prabclus* (Hennig, C y col, 2004) que realiza agrupamientos de especie a partir de una matriz de distancias de presencia-ausencia, y con el paquete *phangorn* (Lockhart, PJ y col, 1994) el cual permite estimar los árboles filogenéticos utilizando diferentes métodos de reconstrucción (UPGMA para árboles con raíces o, alternativamente Neighbor Joining, sin raíces). Para estimar la relación entre la riqueza de genotipos de cianobacterias (bandas de TGGE) y las concentraciones de nutrientes en los puntos de muestreo se llevaron a cabo una serie de regresiones no lineales utilizando el programa SigmaPlot 9.0 con el programa estadístico SigmaStat integrado. El test estadístico aplicado fue el de Durbin-Watson.

En cuanto a la diversidad de los perfiles genéticos, se calculó utilizando el índice de Diversidad de Shannon (Shannon & Weaver, 1963) de acuerdo con la fórmula:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log p_i$$

Donde P_i representa la proporción de una banda en particular y S es el número total de bandas en el perfil. Las posibles diferencias significativas entre los puntos de muestreo y a nivel estacional, se calcularon mediante un análisis de la varianza aplicando un ANOVA (Test de Tukey) mediante el software SigmaPlot 9.0 con el programa estadístico integrado SigmaStat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Abundancia y estructura de la comunidad de cianobacterias en relación con la calidad del agua del río Guadarrama

I. ABUNDANCIA Y ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD DE CIANOBACTERIAS EN RELACIÓN CON LA CALIDAD DEL AGUA DEL RÍO GUADARRAMA.

I.1. Características físico-químicas del agua del río Guadarrama: calidad del agua.

A continuación se muestran los resultados correspondientes a la evolución espacio-temporal de los parámetros físico-químicos más destacables medidos a lo largo de las distintas campañas de muestreo realizadas en el río Guadarrama (Fig. 13 y Fig. 14).

Caudal del río. La figura 13.A muestra que el mayor caudal correspondió al otoño del 2006 y el menor al verano del 2007. En cuanto a diferencias entre puntos, el caudal resultó siempre mayor en el punto GU3, seguido del punto GU2 y, por último, con un caudal muy escaso, GU1. Los caudales medios en los tres puntos de muestreo fueron de 2.14 m³/s en GU1, 28.3 en GU2 y 34.74 en GU3. En comparación con otros años, se puede decir que los caudales han sido bastante abundantes debido a que este año las precipitaciones han sido muy intensas.

Oxígeno disuelto (% saturación). En general, como se puede observar en la figura 13.B, existe una disminución aguas abajo de la saturación de oxígeno, de manera que el punto GU1 presentó siempre una mayor saturación, seguido de GU2 y GU3. El % de saturación en el GU1 fue mayor en el invierno de 2007, permaneciendo estable el resto de las campañas excepto en verano. En esta estación, el punto GU1 presentó un valor menor de saturación de oxígeno debido a que apenas llevaba agua y el caudal era escaso. Los valores en GU2 y GU3 permanecieron estables, excepto en primavera y verano que disminuyeron ligeramente. El valor medio de saturación de oxígeno en los distintos puntos fue de 80.6% en GU1, 78% en GU2 y 65.5% en GU3.

Conductividad. En la figura 13.C se observan los cambios en esta variable siendo el mayor valor el de verano, siguiéndole la primavera. Comparando entre puntos, se puede decir que existe una tendencia creciente aguas abajo, siendo GU3 el punto que presentó un mayor valor de conductividad. La conductividad media de los distintos puntos fue la siguiente de 152.12 µS/cm en GU1, 424 en GU2 y 462.5 en GU3.

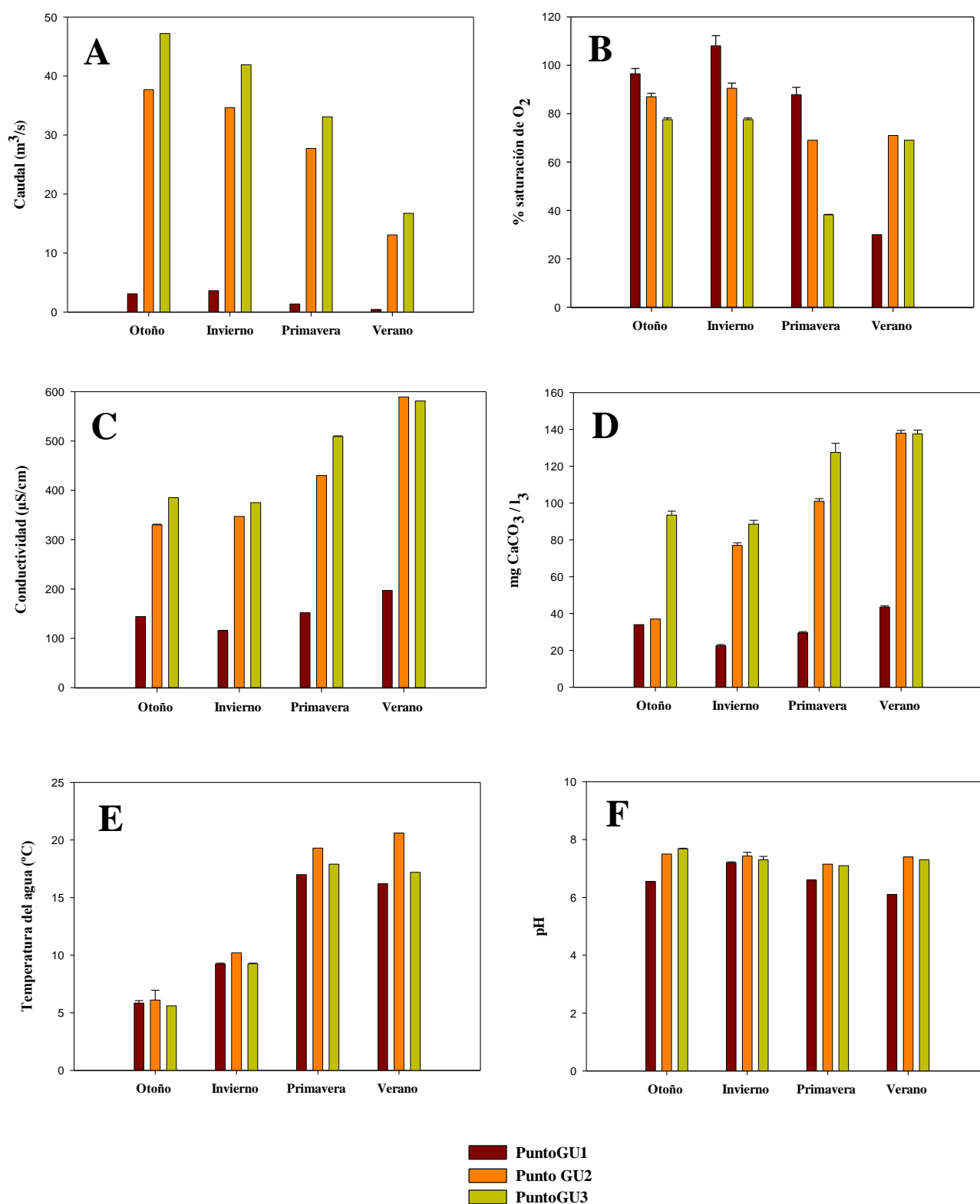


Figura 13. Evolución espacio temporal de las variables físico-químicas del agua del río Guadarrama: Caudal (A), Oxígeno disuelto (B), Conductividad (C), Dureza debida al calcio (D), Temperatura del agua (E) y pH (F).

Dureza debida al calcio. El valor de dureza del agua debida al calcio se puede ver en la figura 13.D. Los valores más altos se observaron en verano, correspondiendo el menor al otoño de 2006. En cuanto a la evolución espacial, se observó un aumento de la dureza aguas abajo, siendo GU3 el punto que presentó los valores más altos. Los valores medios de dureza debida al calcio fueron de 32.4 mg de CaCO_3 / l en GU1, 88.2 en GU2 y 111.7 en GU3.

Temperatura del agua. La evolución estacional de la temperatura del agua (Fig. 13.E), muestra que la primavera y el verano son las estaciones en las que el agua presentó mayor temperatura, como era de esperar. En término medio, la temperatura en GU1 fue 12.1 °C, en GU2 14 °C y en GU3 12.5 °C, presentando el GU2 el valor más alto.

pH. Como se puede observar en la figura 13.F el valor de pH fue relativamente estable en los diferentes puntos de muestreo como a nivel estacional. Presentó pequeñas fluctuaciones rondando siempre la neutralidad, aumentando ligeramente aguas abajo. El valor medio de pH en los distintos puntos de muestreo fue de 6.61 en GU1, 7.37 en GU2 y 7.34 en GU3.

Nitrógeno Inorgánico. La figura 14 ilustra el contenido en nitrógeno inorgánico medido como NID (Nitrógeno Inorgánico Disuelto) (Fig. 14.A) como la suma de los N-NO_2^- (Fig. 14.B), N-NO_3^- (Fig. 14.C) y N-NH_4^+ (Fig. 14.D). La concentración de NID resultó mayor en verano, observándose los valores menores en primavera, invierno y otoño sucesivamente. Se pueden ver diferencias entre puntos, de manera que GU3 y GU2 presentaron valores muy similares, siendo los de GU2 algo mayores. El valor en GU1 fue siempre mucho menor que en los otros puntos, con valores casi inapreciables. Los valores medios de NID fueron de 0.07 mg NID / l en GU1, 5.1 en GU2 y 4.1 en GU3. Además se puede observar (Fig. 10.C) que el nitrato es la especie química que más contribuye al NID (en especial en verano), siendo los nitritos los que menos. La concentración de amonio sin embargo es mucho menor, encontrándose los valores más altos en primavera.

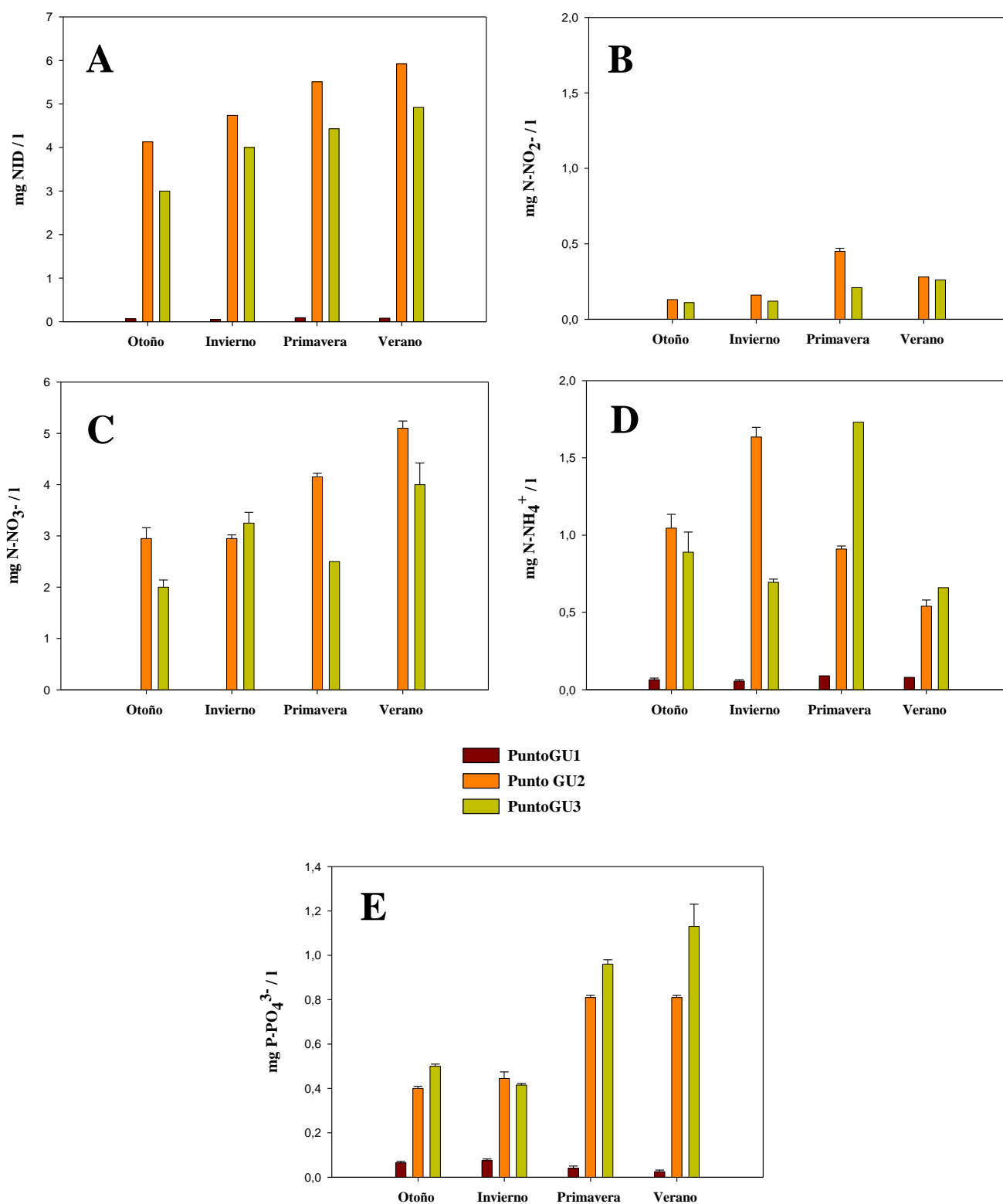


Figura 14. Evolución espacio temporal de los nutrientes del agua del río Guadarrama: nitrógeno de nitratos (N-NO₂⁻) (C), nitrógeno de nitritos (N-NO₃⁻) (B), Nitrógeno de amonio (N-NH₄⁺) (D), nitrógeno inorgánico disuelto (NID) (A) como suma de los otros tres y la concentración de fósforo como Fósforo reactivo soluble (PRS) (E).

Fósforo. En la figura 14.E se muestra el contenido en fósforo medido como Fósforo Reactivo Soluble (PRS, $P-PO_4^{3-}$). Los valores mayores se observaron en verano y primavera con valores muy similares, y los más bajos en invierno y otoño de 2006, con apenas diferencias entre ambas estaciones. Aún así se puede observar una ligera diferencia entre los valores más altos en las estaciones calurosas con respecto a las más frías. En cuanto a las variaciones espaciales de este parámetro, el punto GU3, el más alejado de cabecera, fue el que presentó en general valores más altos de PRS, presentando GU2 valores ligeramente inferiores (excepto en invierno) y GU1 valores muy bajos. Los valores medios PRS de los distintos puntos se muestran a continuación: 0.05 mg/l PRS en GU1, 0.62 en GU2 y 0.75 en GU3.

I.2. Descripción de las especies de cianobacterias epilíticas en el río Guadarrama: identificación taxonómica.

Con el fin de identificar las especies de cianobacterias del epilíton procedente del río Guadarrama, se llevó a cabo en primer lugar un abordaje desde el punto de vista morfológico, en donde se observaron al microscopio óptico diferentes parámetros morfológicos (forma de la colonia, color, tamaño de las células vegetativas, heterocistos y su localización, presencia o no de acinetos, etc.), basándonos en la taxonomía tradicional. Las especies fueron identificadas utilizando tanto los cultivos en placa como las muestras de extracto de epilíton fijadas con formol.

En total se han descrito 17 especies en los puntos seleccionados y en las cuatro campañas de muestreo en el río Guadarrama. Así, en la tabla 10 se enumeran las especies encontradas separadas por órdenes y familias. A continuación se realiza una descripción a nivel macroscópico y microscópico de las especies encontradas pertenecientes a los distintos órdenes: Chroococcales (Tabla 11; Figs. 15 y 18), Oscillatoriales (Tabla 12; Figs. 16 y 18) y Nostocales (Tabla 13; Figs. 17 y 18).

Tabla 10. Especies de cianobacterias encontradas en el epilíton del río Guadarrama agrupadas por órdenes y familias.

ORDEN CHROOCOCCALES		
MYCROCYSTACEAE	CHROOCOCCACEAE	CHAMAESIPHONACEAE
<ul style="list-style-type: none">- <i>Aphanocapsa muscicola</i> (Fig. 15, A y Fig. 18, A) (MENEGH.) WILLE- <i>Aphanocapsa rivularis</i> (Fig. 15, B) (CARM.) RABENH.- <i>Pleurocapsa minor</i> (Fig. 15, C) (BREB.) KOM. et ANAGN.- <i>Synechococcus elongatus</i> (Fig. 15, D) (NÄG.) NÄG.	<ul style="list-style-type: none">- <i>Chroococcus minutus</i> (Fig. 15, E y Fig. 18, B) (KÜTZ.) NÄG.	<ul style="list-style-type: none">- <i>Chamaesiphon investiens</i> (Fig. 15, F y Fig. 18, C) SKUJA- <i>Chroococcus polymorphus</i> (Fig. 18, D) (ROSTAFIN.) HANSG.
ORDEN OSCILLATORIALES		
PSEUDANABAENACEAE	PHORMIDIACEAE	
<ul style="list-style-type: none">- <i>Pseudanabaena catenata</i> LAUTERBORN (Fig. 16, C)- <i>Leptolyngbya tenuis</i> (GOM.) ANAGN. et KOM. (Fig. 16, F)- <i>Leptolyngbya boryana</i> ANAGN. et KOM. (Fig. 16, A y Fig. 18, E)- <i>Leptolyngbya nostocorum</i> (Fig. 16, B) (BORN. ex GOM.) ANAGN. et KOM.	<ul style="list-style-type: none">- <i>Phormidium</i> sp. (Fig. 16, D y Fig. 18, F) (GOM.) ANAGN. et KOM.- <i>Phormidium autumnale</i> (Fig. 16, E) (GOM.) ANAGN. et KOM.	
ORDEN NOSTOCALES		
NOSTOCACEAE	MICROCHAETACEAE	
<ul style="list-style-type: none">- <i>Nostoc carneum</i> (Fig. 17, A y Fig. 18, G) AG. ex BORN. et FLAH.- <i>Nostoc piscinale</i> (Fig. 17, C) KÜTZ.- <i>Nostoc punctiforme</i> (Fig. 17, B) (KÜTZ.) HAR	<ul style="list-style-type: none">- <i>Tolypothrix penicillata</i> THUR. (Fig. 17, D y Fig. 18, H)	

Tabla 11. Descripción de las especies de cianobacterias del orden Chroococcales encontradas en el epilíton del río Guadarrama. En negrita aparecen aquellas que han sido aisladas en este estudio. Ø= diámetro célula. A= ancho de célula; L= largo de célula.

Especie	Nº Col. *	Dimensiones	Descripción colonia	Descripción microscópica	Fotos
<i>Aphanocapsa muscicola</i>	UAM 385	2.1-4.2 µm Ø	Colonia pequeña verde-azulada compacta	Células redondeadas o ligeramente achatadas. Grupos de 2 células. Color verde-azulado intenso.	Fig. 15, A Fig. 18, A
<i>Aphanocapsa rivularis</i>	UAM 390	0.8-4.8 µm Ø	Marronácea mucosa o con punteado verde-azulado oscuro	Células redondeadas o ligeramente achatadas. Grupos de 2 células. Color marronáceo o verde-azulado intenso.	Fig. 15, B
<i>Pleurocapsa minor</i>	UAM 388	4.2-9.3 µm Ø	Mucosa marronácea casi negra	Células irregularmente esféricas rodeadas por una envuelta fina. Color marrón o negro.	Fig. 15, C
<i>Synechococcus elongatus</i>	UAM 406	A: 0.6-1.36 µm L= 2.94-6.7 µm	Extendida y disgregable. Color azulado brillante	Células alargadas a veces formando pseudofilamentos de 3-4 células. Color verde-azulado pálido.	Fig. 15, D
<i>Chroococcus minutus</i>	-	4.2-5.9 µm Ø	Matriz gelatinosa incolora con punteado marrón. A veces sin colonia.	Células esféricas o hemiesféricas solitarias o en grupos de 2 a 8 células, rodeadas por una vaina homogénea. Color verde-azulado.	Fig. 15, E Fig. 18, B
<i>Chamaesiphon investiens</i>	UAM 386	Exocito: 2.94-3.78 µm Ø Célula: A: 4.2-6.0 µm L= 5.9-9.2 µm	Colonia marronácea casi negra formando bolas rígidas	Célula vegetativa alargada con bordes redondeados con uno o varios exocitos. Pseudovagina fina. Color verde oscuro o marronáceo.	Fig. 15, F Fig. 18, C
<i>Chamaesiphon polymorphus</i>	-	Exocito: 3.2-4.8 µm Ø Célula: A: 3.2-7 µm L= 4.3-5.2 µm	Nunca se ha visto en colonia	Células elipsoidales o redondas, a veces ligeramente poligonales con 1-3 exocitos. Aparecen formando grupos irregulares. Pseudovagina fina. Color verde oscuro o marronáceo.	Fig. 18, D

* UAM, Colección de cultivos UAM, Universidad Autónoma de Madrid

Tabla 12. Descripción de las especies de cianobacterias del orden Oscillatoriales encontradas en el epilíton del río Guadarrama. En negrita aparecen aquellas que han sido aisladas en este estudio. A= ancho de célula; L= largo de célula.

Especie	Nº Col.*	Dimensiones	Descripción colonia	Descripción microscópica	Fotos
<i>Leptolyngbya boryana</i>	UAM 391	A: 2.1-3.2 µm L= 1.2-3.6 µm	Extendida, formada por filamentos finos distinguibles. Color verde-azulado intenso o pálido	Filamentos largos y flexibles, de vaina visible, a veces gruesa y separada del filamento. Células cuadradas a alargadas, ligeramente constrictas. Célula final redondeada. Abundantes falsas ramificaciones.	Fig. 16, A Fig. 18, E
<i>Leptolyngbya nostocorum</i>	UAM 387	A: 1.2-2 µm L= 1.26-3.8 µm	Mancha verde-azulada intensa o amarillenta, incrustada en el agar. Filamentos muy finos a veces diferenciados.	Filamentos largos y flexibles de vaina fina pegada al tricoma. Células desde cuadradas a alargadas, ligeramente constrictas. Célula final redondeada. Ramificaciones poco frecuentes.	Fig. 16, B
<i>Leptolyngbya tenuis</i>	-	A: 0.8-2.1 µm L= 1.6-5 µm	Colonia mucosa de filamentos no distinguibles. Color verde pálido. Muchas veces sin colonia.	Filamentos largos, flexibles y finos. Vaina muy fina y pegada al filamento. Células alargadas, ligeramente o nada constrictas. Final redondeado, raramente cónico.	Fig. 16, F
<i>Pseudanabaena catenata</i>	UAM 412	A: 1.47-2.4 µm L= 1.68-5.2 µm	Extendida, formada por filamentos agrupados, a veces mucosa. Color verde-azulado brillante, marrón y violáceo.	Filamentos cortos de hasta 10 células rectangulares no constrictas, de finales a veces redondeados. Células separadas por aerotopos. Color verde-azulado o pálido.	Fig. 16, C
<i>Phormidium</i> sp.	UAM 361	A: 5-6.7 µm L=2.3-5.3 µm	Filamentos largos y gruesos extendidos por la placa formando rizos. Color verde-azulado intenso a verde pardo.	Filamentos largos y rectos, a veces curvados al final, con vaina fina. Células cuadradas ligeramente constrictas. Célula apical capitada, redondeada y con caliptra.	Fig. 16, D Fig. 18, F
<i>Phormidium autumnale</i>	-	A: 5-6.6 µm L=2.3-3.7 µm	Filamentos largos y finos agrupados y extendidos por la placa, a veces rizados. Color verde-azulado intenso o pardo.	Filamentos largos y flexibles con vaina fina. Células cortas no constrictas. Final redondeado o ligeramente apuntado. No se ha observado caliptra.	Fig. 16, E

* UAM, Colección de cultivos UAM, Universidad Autónoma de Madrid

Tabla 13. Descripción de las especies de cianobacterias del orden Nostocales encontradas en el epilíton del río Guadarrama. En negrita aparecen aquellas que han sido aisladas en este estudio. Ø= diámetro célula. A= ancho de célula; L= largo de célula.

Especie	Nº Col.*	Dimensiones	Descripción colonia	Descripción microscópica	Fotos
<i>Nostoc carneum</i>	UAM 389	Célula: A: 3.36-4.5 µm L: 2.1-6.4 µm Heterocisto: A: 4.56-5.88 µm L: 4.2-6.2 µm Acineto: A: 4.2-6.8 µm L: 5.4-8.1 µm	Aspecto globoso, superficie irregular. Color verde oscuro brillante o marrónáceo.	Filamentos de células esféricas o más largas que anchas y constrictas. Heterocistos desde esféricos hasta elipsoidales. Acinetos globosos desde esféricos hasta elipsoidales, solitarios o en cadenas.	Fig. 17, A Fig. 18, G
<i>Nostoc punctiforme</i>	UAM 393	Célula: Ø: 3.78-4.2 µm Heterocisto: Ø: 3.78-5.4 µm Acineto: A: 4.62-5.46 µm L: 5.8-6.3 µm	Bola o bolas lisas desde verde muy oscuro hasta negro, brillante.	Filamentos a veces muy compactos en vainas gruesas con el heterocisto hacia el exterior. Células vegetativas y heterocistos esféricos y acinetos en general más largos que anchos, generalmente solitarios.	Fig. 17, B
<i>Nostoc piscinale</i>	UAM 394	Célula: Ø: 2.52-5.6 µm Heterocisto: Ø: 4.56-6.4 µm Acineto: Ø: 5.6-7.1 µm	Bola o bolas de superficie rugosa con extensión de filamentos alrededor. Color verde a marrón brillante.	Filamentos de células muy constrictas. Células, heterocistos y acinetos esféricos o ligeramente ovoides. Acinetos solitarios o en cadena.	Fig. 17, C
<i>Tolypothrix penicillata</i>	UAM 392	Filamento: A _{BASE} : 12-18 µm A _{MEDIO} : 10-12 µm Tricoma: A _{BASE} : 10-11.3 µm L _{BASE} : 2.1-10 µm A _{MEDIO} : 6.3-9 µm L _{MEDIO} : 2.5-9 µm Heterocisto: A: 7.9-12.6 µm L: 8.8-15.1 µm Acineto: A: 7-18 µm L: 7.5-18 µm	Filamentos verde-azulados individuales o en pequeños grupos o tapiz desde verde-azulado intenso a marrón brillante formado por agrupación de filamentos. Abundantes ramificaciones.	Filamentos con numerosas falsas ramas, con vaina que cierra el filamento. Células muy constrictas, achatadas. Heterocistos apicales e intercalares. Acinetos esféricos o ligeramente alargados, muchas veces junto al heterocisto, o sueltos o en pares.	Fig. 17, D Fig. 18, H

* UAM, Colección de cultivos UAM, Universidad Autónoma de Madrid

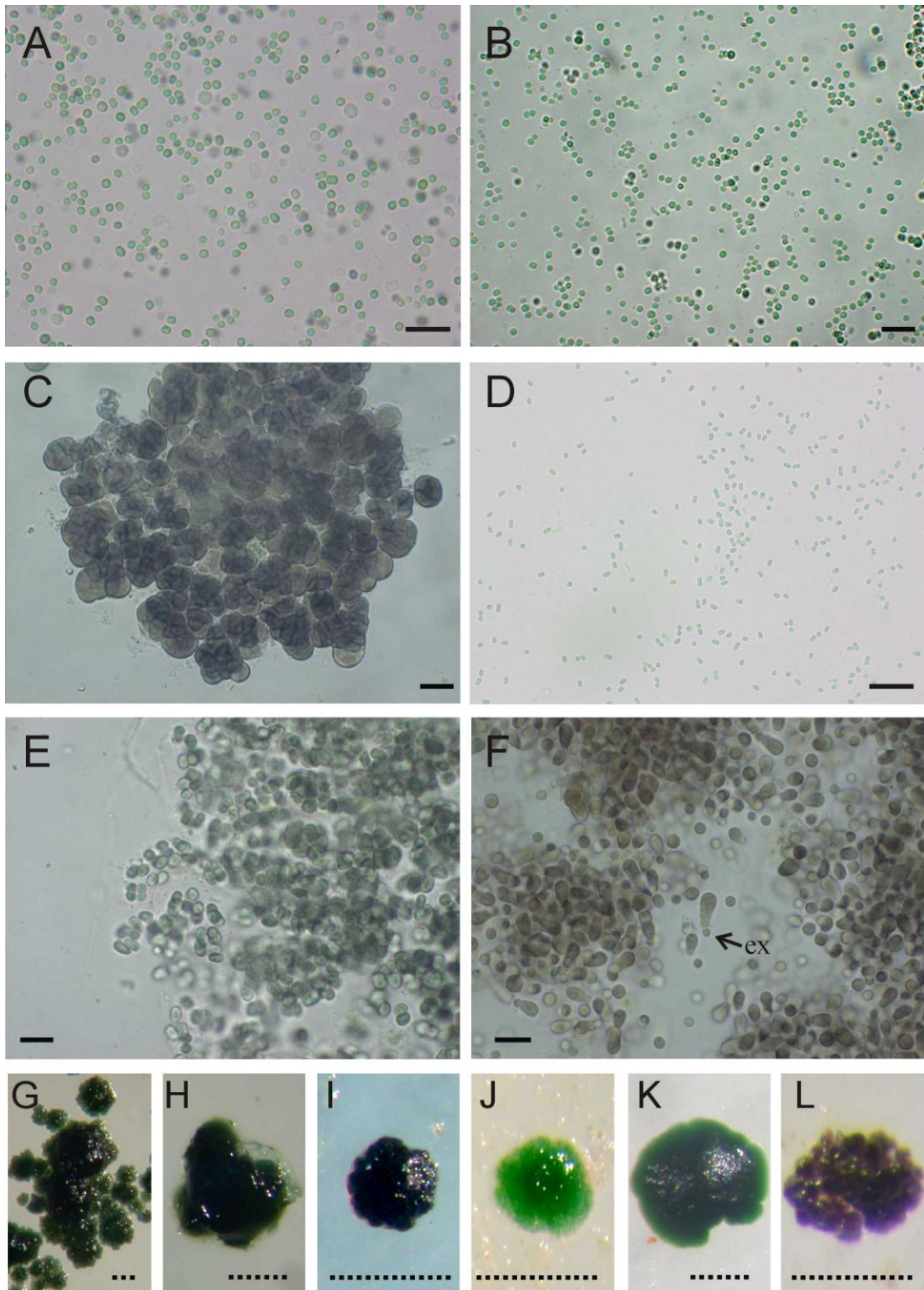


Figura 15. Microfotografías de las cianobacterias pertenecientes al orden Chroococcales encontradas en el río Guadarrama y caracterizadas morfológicamente en este estudio. (A) *Aphanocapsa muscicola* UAM 385; (B) *Aphanocapsa rivularis* UAM 390; (C) *Pleurocapsa minor* UAM 388; (D) *Synechococcus elongatus* UAM 406; (E) *Chroococcus minutus* y (F) *Chamaesiphon investiens* UAM 386, donde se muestra un exocito; (G-L) Aspecto de la colonia encontrada en placa de cada cepa respectivamente. Abreviatura: ex- exocito. Escala línea continua= 10µm; escala línea discontinua=1mm.

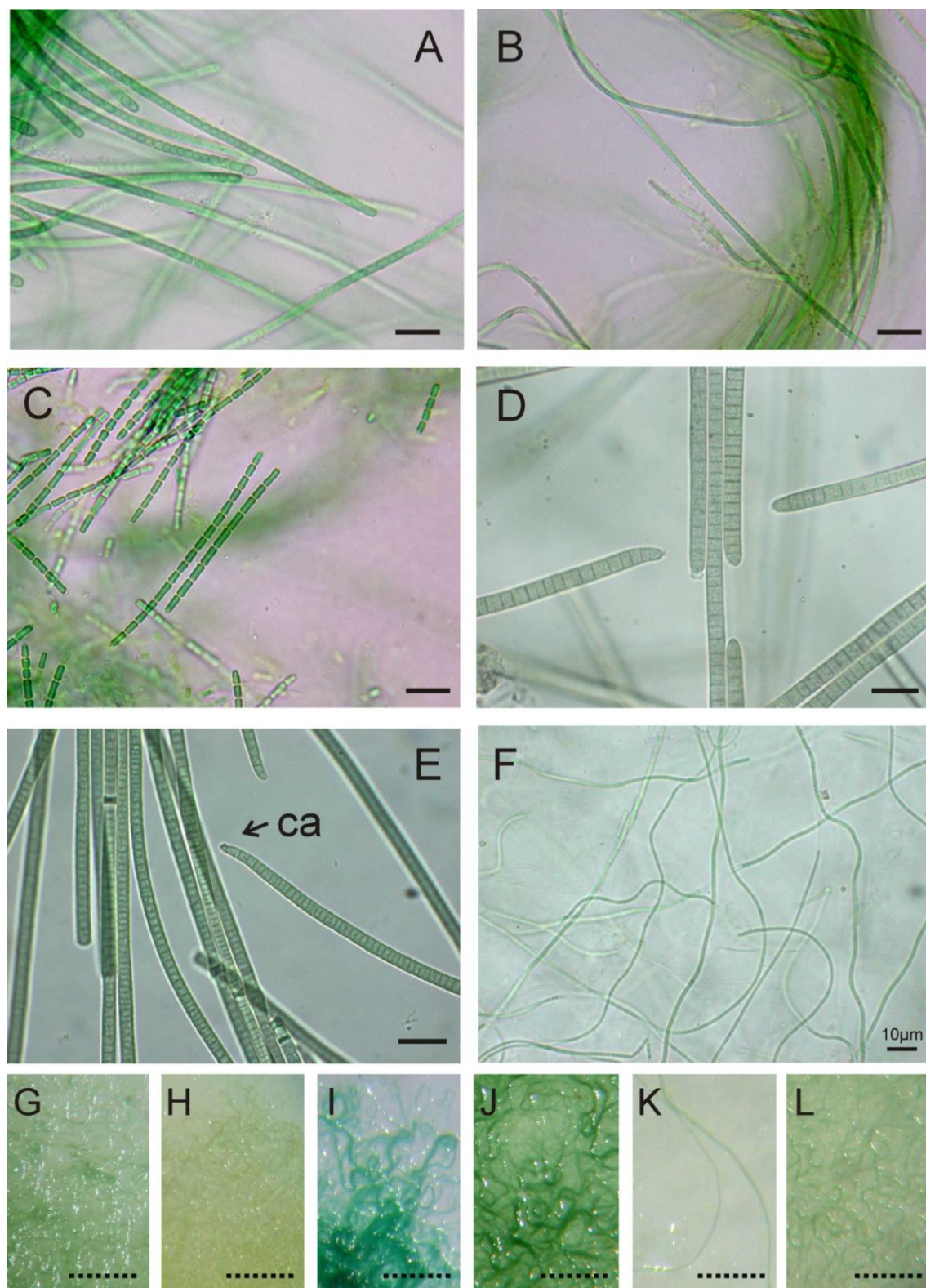


Figura 16. Microfotografías de las cianobacterias pertenecientes al orden Oscillatoriales encontradas en el río Guadarrama y caracterizadas morfológicamente en este estudio. (A) *Leptolyngbya boryana* UAM 391; (B) *Leptolyngbya nostocorum* UAM 387; (C) *Pseudanabaena catenata* UAM 412; (D) *Phormidium* sp. UAM 361; (E) *Phormidium autumnale*, donde se muestra en detalle un filamento con caliptra. (F) *Leptolyngbya tenuis*; (G-L). Aspecto de la colonia encontrada en placa de cada cepa respectivamente. Abreviaturas: ca- caliptra. Escala línea continua= 10μm; escala línea discontinua= 2 mm.

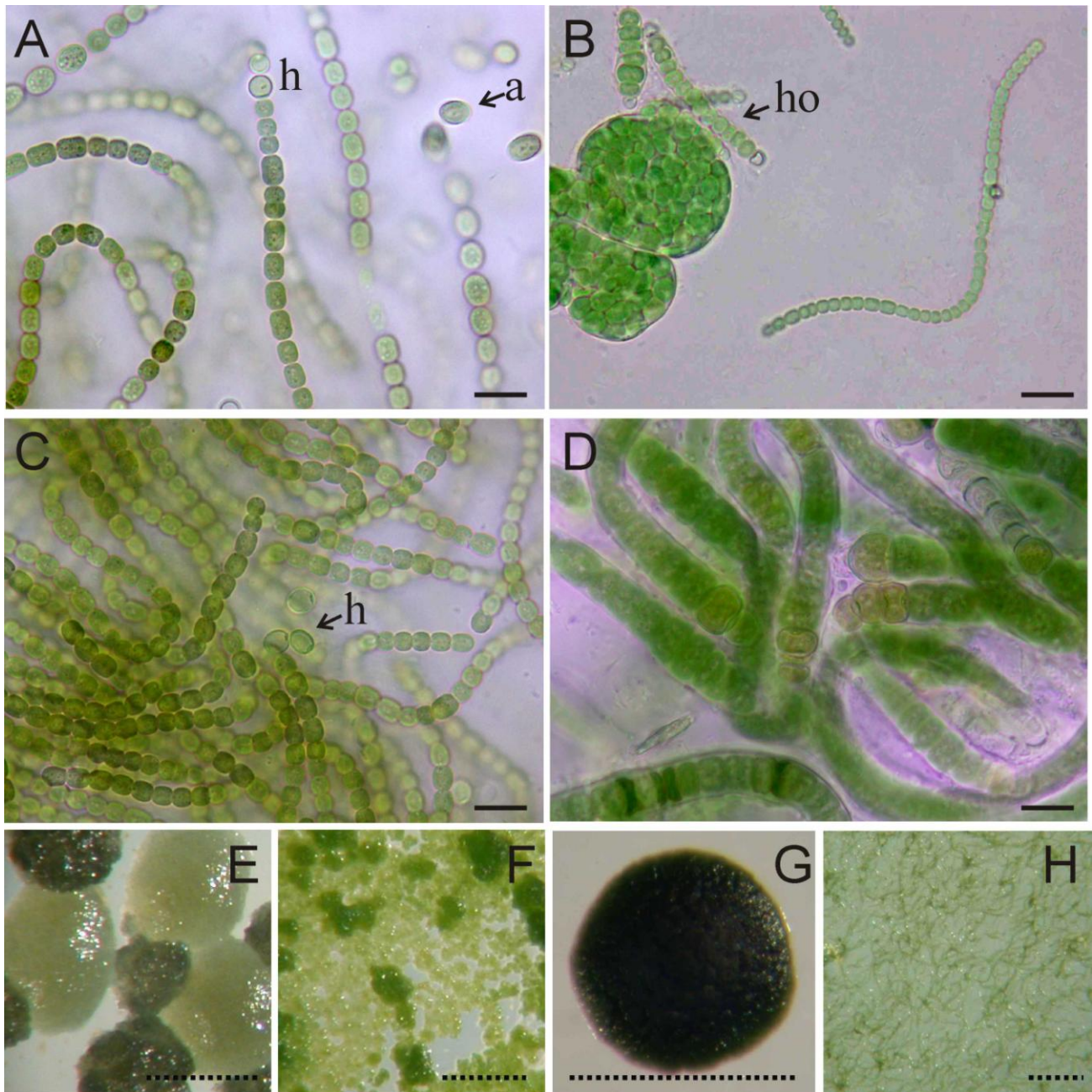


Figura 17. Microfotografías de las cianobacterias pertenecientes al orden Nostocales encontradas en el río Guadarrama y caracterizadas morfológicamente en este estudio. (A) *Nostoc carneum* UAM 389, donde se observa la diferenciación de un acineto; (B) *Nostoc punctiforme* UAM 393. En la misma foto se muestra en detalle un filamento joven. (C) *Nostoc piscinale* UAM 394, donde se observan varios heterocistos; (D) *Tolypothrix penicillata* UAM 392; (E-H) Aspecto de la colonia encontrada en placa de cada aislado respectivamente. Abreviaturas: a- acineto; h-heterocisto; ho-hormogonio. Escala línea continua= 10µm; escala línea discontinua=1mm.

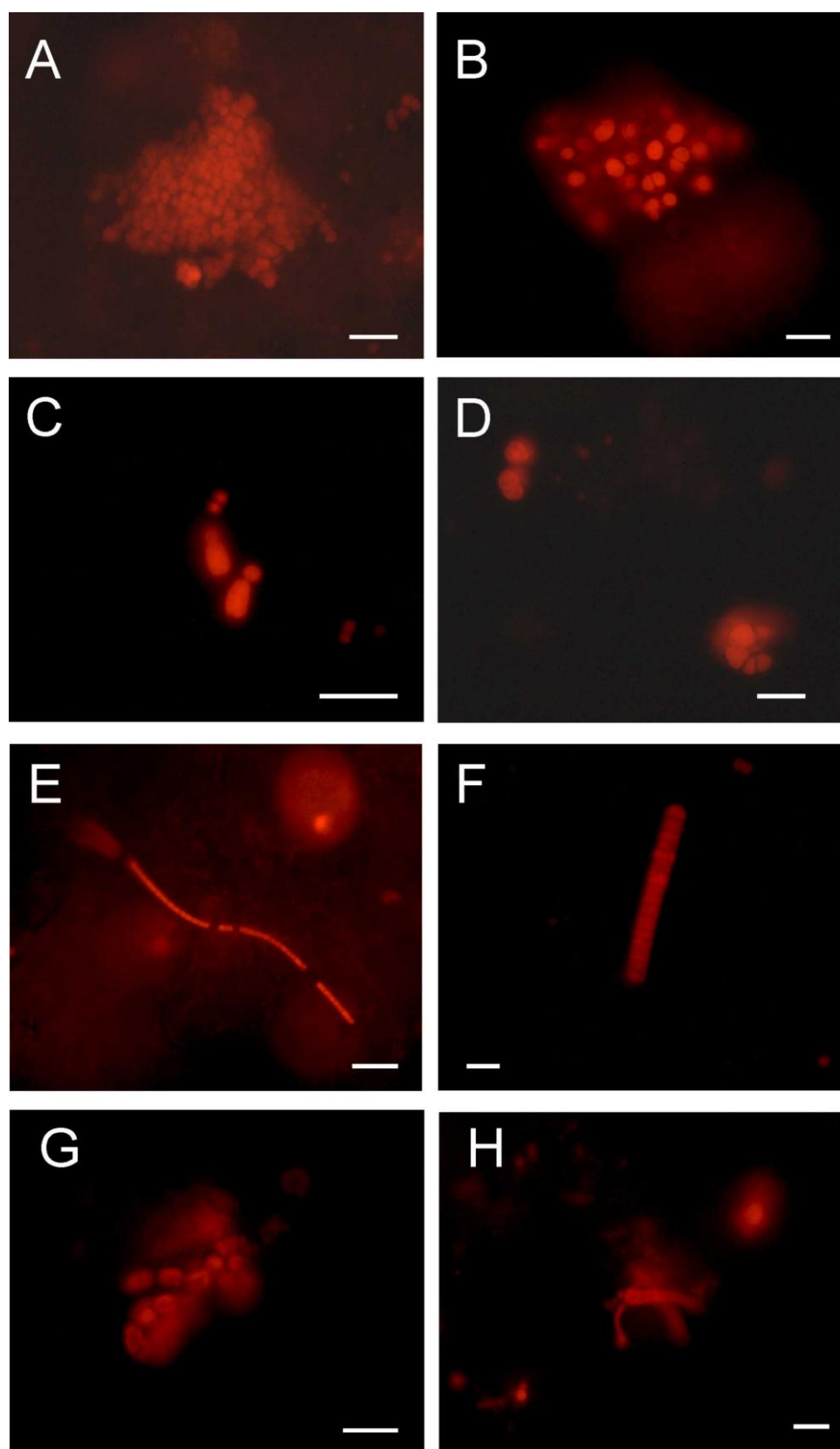


Figura 18. Microfotografías de alguna de las cianobacterias encontradas en las muestras de epilíton del río Guadarrama observadas con epifluorescencia al microscopio. (A) *Aphanocapsa muscicola*; (B) *Chroococcus minutus*; (C) *Chamaesiphon investiens*; (D) *Chamaesiphon polymorphus*; (E) *Leptolyngbya boryana*; (F) *Phormidium* sp.; (G) *Nostoc carneum* y (H) *Tolypothrix penicillata*. Escala= 10µm.

I.3. Estructura y distribución de la comunidad de cianobacterias.

Una vez identificadas las cianobacterias procedentes del epilíton, se llevó a cabo el análisis de la evolución espacio-temporal de la riqueza específica de la comunidad de cianobacterias del río Guadarrama. La estimación se llevó a cabo mediante el recuento directo de presencias de cianobacterias en el extracto de epilíton. En la figura 19 se muestra el número de especies encontradas en los distintos puntos y en las distintas campañas de muestreo, discriminando entre los distintos órdenes taxonómicos.

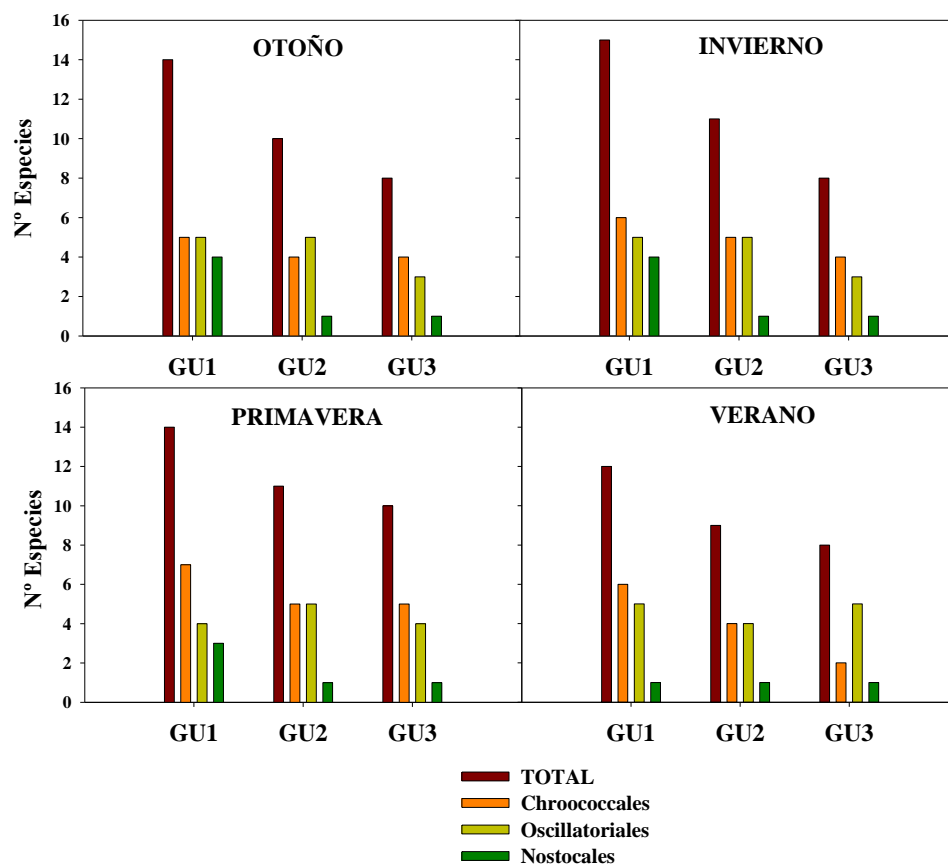


Figura 19. Evolución espacio-temporal de la riqueza específica de cianobacterias en el río Guadarrama agrupada por órdenes.

Como se puede ver (Fig. 19), el número máximo de especies encontradas en un punto es de 15 y los órdenes que incluyen más especies son Chroococcales y Oscillatoriales. Además, generalmente, el punto GU1 presentó mayor riqueza específica que el GU2 y éste a su vez mayor que el GU3. Además al observar la riqueza por órdenes el punto GU1 presentó una mayor riqueza de especies pertenecientes a los órdenes Chroococcales y Nostocales, siendo la riqueza específica del orden

Oscillatoriales variable según la estación. Analizando esta riqueza por la capacidad de las especies de diferenciar heterocistos el punto GU1 presentó de nuevo mayor riqueza de especies con heterocistos que GU2 y GU3, mostrando los puntos GU2 y GU3 una riqueza similar. Estos valores permiten decir que las especies del orden Chroococcales como las Oscillatoriales son mayoritarias, presentando variaciones en cuanto a su distribución espacial debida a cambios en la calidad del agua que serán comentados más adelante. El orden Nostocales es el que presenta menor número de especies sujetas además a mayor variabilidad estacional y con una clara disminución en los puntos aguas abajo.

La riqueza específica y la abundancia de cianobacterias son dos parámetros que definen la comunidad biológica de los distintos puntos de muestreo y que son interesantes relacionar. Con la intención de determinar las variaciones en la diversidad de esta comunidad relacionadas con los cambios ya descritos en la calidad del agua del río Guadarrama, se estudió la evolución espacio temporal de la abundancia relativa de las distintas especies de cianobacterias descritas (Fig. 20). La abundancia relativa de cada especie se calculó como el porcentaje de abundancia que presenta una especie con respecto al total de la muestra. Para facilitar la visualización de los datos, se han utilizado las clases de cobertura propuestas por Necchi Jr. y colaboradores (1991), con una pequeña modificación al incluir los datos de presencia en cultivo:

0: Especie que no aparece

1: <1% de abundancia o especie vista sólo en placa. Denominación: “rara”

2: 1-10% de la abundancia. Denominación: “escasa”

3: 11-25% de abundancia. Denominación: “común”

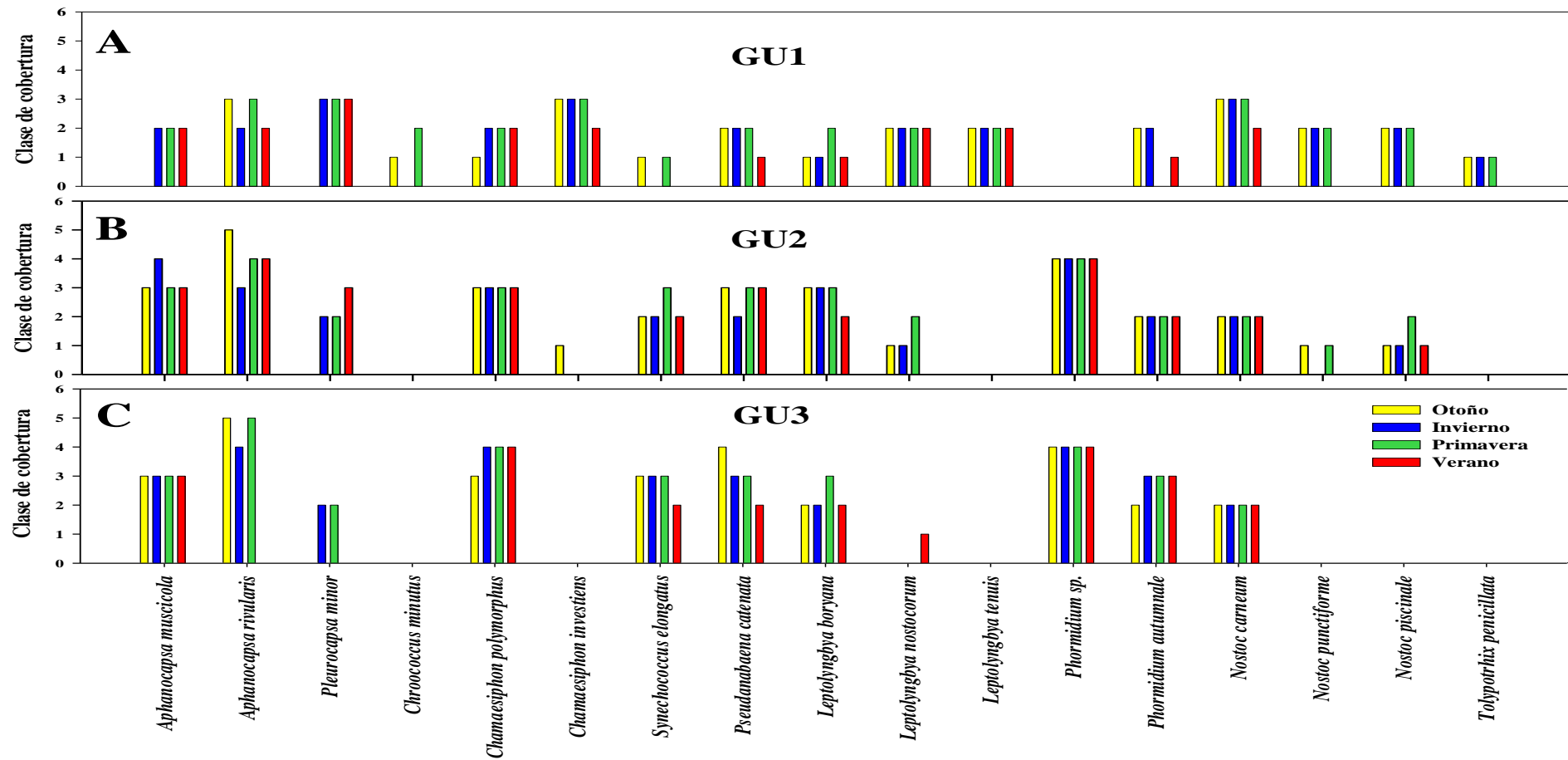
4: 26-50% de la abundancia. Denominación: “abundante”

5: 51-75% de la abundancia. Denominación “predominante”

6: 76-100% de la abundancia. Denominación: “dominante”

En dicha figura (Fig. 20) se puede observar de forma clara la composición de la comunidad de cianobacterias de los distintos puntos de muestreo. Esta comunidad en el punto GU1 es muy estable en el tiempo y no se nota dominancia clara de ninguna especie (todas las especies presentan abundancia entre *común* y *escasa*).

Figura 20. Evolución espacio-temporal de la abundancia relativa de cianobacterias en el epilíton del río Guadarrama, calculada según Necchi y colaboradores (1999).



Sin embargo, hay que destacar que las cianobacterias con heterocistos presentan mayor abundancia en este punto en comparación con el resto. De hecho, en GU2, de las cuatro especies con heterocistos, sólo *Nostoc piscinale* se ha descrito como *escasa* catalogándose el resto como *rara*. En GU3, sólo se ha visto la presencia de *Nostoc carneum* catalogada como *escasa*. En el punto GU2 (Fig. 20, B), y especialmente en GU3 (Fig. 20, C) se puede observar la dominancia de algunas especies, presentando las demás menor abundancia. Véase por ejemplo cómo sobresale en los puntos GU2 y GU3 la abundancia de *Aphanocapsa rivularis*, *Chamaesiphon polymorphus*, *Synechococcus elongatus* y *Phormidium autumnale*. Además, se observó que algunas especies no aparecieron en todos los puntos de muestreo. *Chroococcus minutus*, *Leptolyngbya tenuis* y *Chamaesiphon investiens* y las cianobacterias heterocísticas (excepto *Nostoc carneum*) fueron vistas sólo en GU1 y en GU2 definidas como raras, y *Phormidium* sp. fue observada solamente en GU2 y GU3. Así, podemos distinguir entre tres grupos de especies en función de su tolerancia a la contaminación:

- Especies sensibles, que desaparecen o disminuyen su abundancia en puntos contaminados: *Tolypothrix penicillata*, *Chroococcus minutus* y *Leptolyngbya tenuis* son las especies más sensibles a incrementos en la eutrofización de las aguas. *Nostoc punctiforme*, *Nostoc piscinale*, *Nostoc carneum*, *Pleurocapsa minor*, *Chamaesiphon investiens* y *Leptolyngbya nostocorum* son especies sensibles pero en menor medida que las anteriores, al no aparecer en GU3 (excepto *P. minor*) aunque sí en GU2. En general, las especies del orden Nostocales son especies relativamente sensibles ya que disminuyen su abundancia en los puntos GU2 y GU3 (dándose probablemente en formas de resistencia).
- Especies tolerantes, que aparecen tanto en puntos oligotróficos como eutróficos, pero aumentan algo su abundancia en los puntos contaminados: *Aphanocapsa muscicola*, *Pseudanabaena catenata* y *Leptolyngbya boryana*.
- Especies características de puntos contaminados, es decir, que aparecen principalmente y en gran abundancia en condiciones eutróficas-hipertróficas: *Aphanocapsa rivularis*, *Chamaesiphon polymorphus*, *Synechococcus elongatus* y *Phormidium autumnale*. La más destacada es *Phormidium* sp. que no se observó nunca en el punto GU1.

I.4. Caracterización genética y análisis filogenético de las cianobacterias aisladas.

Con el objetivo de caracterizar genéticamente las distintas poblaciones de cianobacterias encontradas en el río Guadarrama, se procedió a amplificar un fragmento de aproximadamente 1200 pb del gen ARNr 16S de los distintos cultivos aislados. Previamente a la secuenciación directa de los aislados, se procedió a comprobar la pureza de cada cultivo aislado mediante la técnica TGGE. En la figura 21 se muestra la posición de bandas correspondiente a cada aislado.

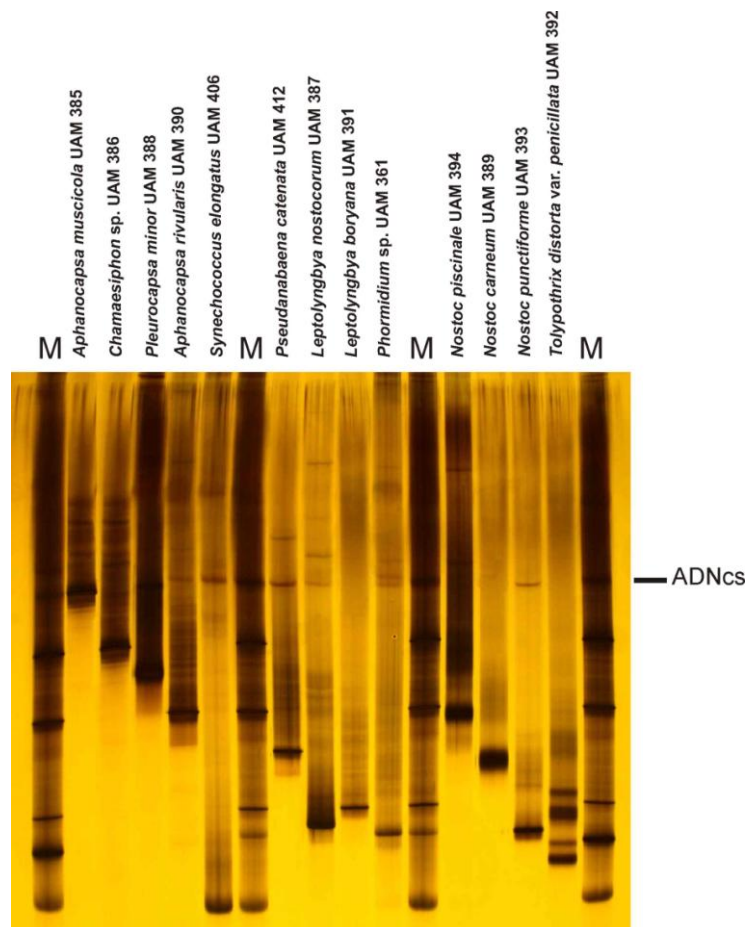


Figura 21. Análisis mediante electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico (TGGE) de los productos amplificados por PCR del gen 16S ARNr (500 pb) de las distintas cepas aisladas del epilíton del río Guadarrama. M indica el marcador o patrón utilizado compuesto por la mezcla de los productos de PCR de cada cepa. La banda común señalada en todas las líneas representa artefactos de ADN de cadena simple (ADNcs).

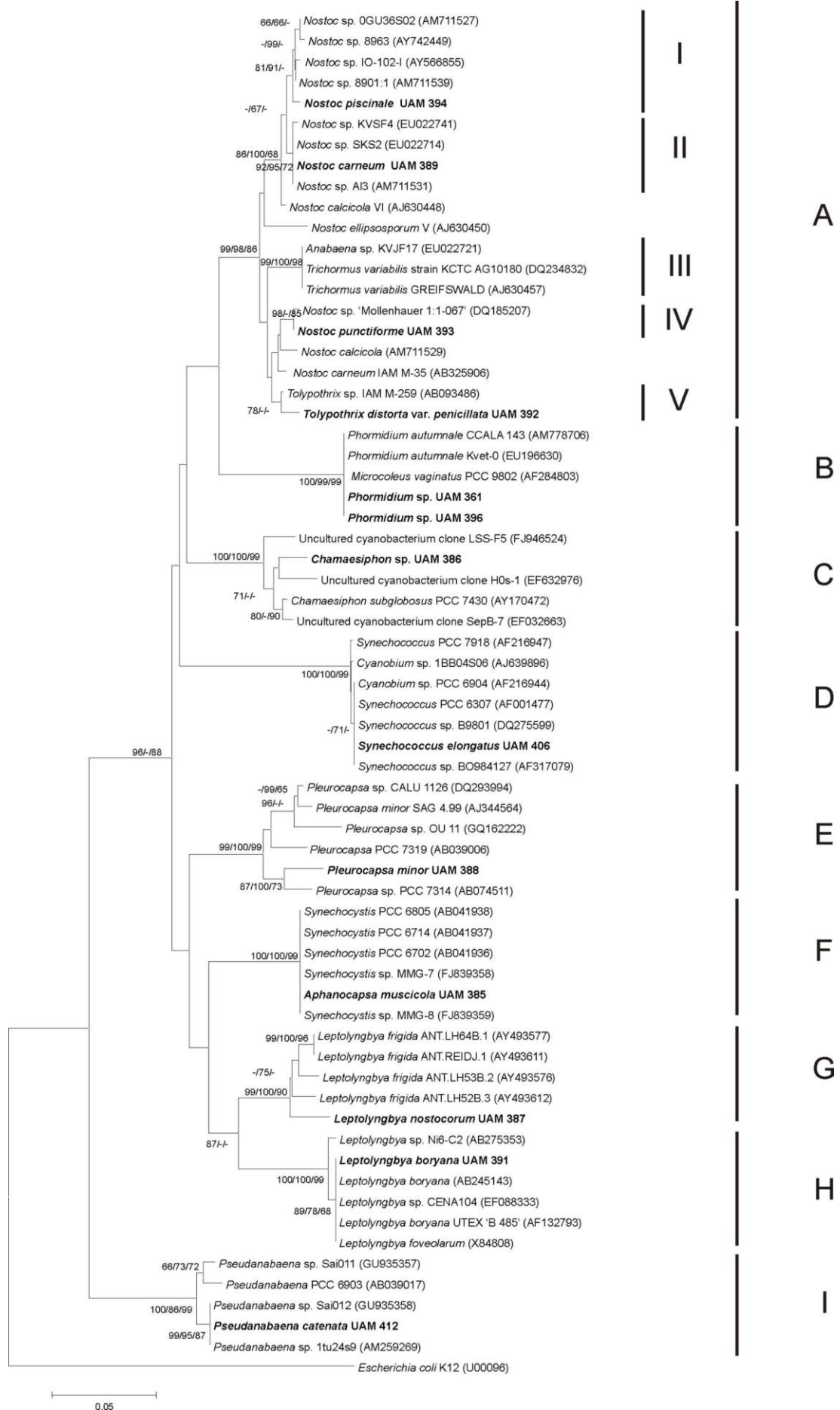
El análisis por TGGE de las cepas aisladas mostró una única banda para cada cultivo, excepto en la cepa *Tolypothrix penicillata* UAM 392 que contiene dos bandas. La presencia de dichas bandas puede significar que el aislado podría tener más de una copia del operón del gen 16S ARNr, aunque con mínimas diferencias en sus secuencias, como ya se ha descrito previamente (Wintzingerode y col., 1997; Speksnijder y col.,

2001). Además, el conjunto de todas las bandas fueron coherentes con los resultados de su correspondiente secuenciación directa mediante la extracción y secuenciación de las bandas obtenidas. En las siguientes aplicaciones de la técnica de TGGE, se utilizó como marcador de referencia los amplicones de cada aislado en los geles de TGGE con las muestras de epilíton del río Guadarrama.

Una vez comprobada la pureza de los aislados se procedió a la amplificación y secuenciación directa del gen 16S ARNr de cada uno de ellos. Las secuencias obtenidas de dicho gen fueron utilizadas junto con secuencias procedentes de las bases de datos (GenBank) para discutir la posición filogenética de la comunidad de estudio dentro de la radiación cianobacteriana. Tanto los análisis de parsimonia (MP) como los de distancia (NJ) y de máximo likelihood (ML), generaron árboles filogenéticos con topologías muy similares, por lo que se muestra sólo uno de ellos (NJ, Fig. 22). En conjunto, hubo un buen soporte de bootstrap para los principales grupos y para muchas de las ramas próximas a las ramas terminales.

Dentro del árbol filogenético se observaron 9 grupos de los cuales el grupo **A** comprende las cianobacterias heterocistas aisladas pertenecientes a los géneros *Nostoc* y *Tolypothrix*, sustentado a su vez por valores de bootstrap altos (99/98/86 para los análisis de NJ, ML y MP, respectivamente). Dentro de este grupo se encontraron distintos subgrupos pertenecientes a las distintas cepas aisladas. El grupo **I** lo constituyó el cultivo identificado como *Nostoc piscinale* UAM 394 junto con secuencias de las bases de datos con valores de similitud que variaron desde el 97.8 al 98%. Muy próximo a este grupo se situó el cultivo *Nostoc carneum* UAM 389 en el grupo **II** con valores de bootstrap altos (92/95/72). La similitud de las secuencias que componen este grupo se situó dentro del rango del 99.4 y el 99.9%. Ambos cultivos, *N. piscinale* y *N. carneum*, mostraron una identidad del 96.7%. El cultivo identificado como *Nostoc punctiforme* se ubicó dentro del grupo **IV**, más distanciado, con un soporte alto y con identidades encontradas dentro del grupo del 97.5%.

Figura 22. Árbol filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S (1200 pb) de los cultivos de las distintas cianobacterias aisladas del río Guadarrama. Este árbol se construyó a partir de los análisis de neighbour-joining (NJ), maximum-likelihood (ML) y maximum-parsimony (MP). Se muestran los valores de bootstrap mayores de 65%. Las secuencias determinadas en este estudio aparecen en negrita. El n° de acceso de las secuencias empleadas para la construcción de este árbol filogenético se indica después del nombre del taxón →



Comparando las secuencias de los tres cultivos, se encontró que la similitud de este último entre *Nostoc carneum* y *Nostoc piscinale* fue de 94.5% y de 93.8%, respectivamente. Estos resultados filogenéticos indicaron que nuestros datos moleculares fueron congruentes con la caracterización morfológica realizada. Por último, el grupo **V** contiene al aislado *Tolypothrix penicillata* con un alto soporte e identidades encontradas del 96.7% con otra cepa de la base de datos.

El grupo **B** lo compone el cultivo aislado *Phormidium* sp. junto con secuencias identificadas de géneros pertenecientes a la familia Phormidiaceae con un soporte elevado (100/99/99) y con porcentajes de similitud entre el 99.4 al 100%. Otro grupo definido por un gran soporte de bootstrap es el grupo **C**. Lo conforman la cepa *Chamaesiphon* sp. UAM 386 (Chroococcales) y secuencias mayoritariamente de cianobacterias sin cultivar sin una identificación taxonómica clara. Según los valores de similitud entre las distintas secuencias oscilaron entre el 97.1 y 97.5%. Otro grupo de cianobacterias no filamentosas pertenecientes al orden Chroococcales (grupo **D**) lo formaron la secuencia del aislado *Synechococcus elongatus* UAM 406 acompañada con secuencias de las bases de datos tanto del mismo género como del género *Cyanobium*. Los valores tanto de bootstrap como de porcentajes de similitud entre ellas fueron elevados (99.9-100%). El siguiente conjunto lo constituyó el grupo **E**, compuesto por la cepa aislada *Pleurocapsa minor* UAM 388 y las secuencias pertenecientes al mismo género con alto soporte (99/100/99). Los valores de similitud encontrados se situaron entre el 95.2 al 96.7%. Próximo a este grupo, se sitúa el grupo **F** con un alto soporte (100/100/99), compuesto por la cepa *Aphanocapsa muscicola* UAM 385 y secuencias mayoritariamente pertenecientes al género *Synechocystis* con valores de similitud encontrados que variaron entre el 99 y el 99.6%.

Los siguientes grupos (**G** y **H**) lo constituyeron respectivamente dos cepas de cianobacterias filamentosas pertenecientes al género *Leptolyngbya*, cuyo porcentaje de similitud entre ambas fue del 89.8%. El grupo **G** está representado por la cepa *Leptolyngbya nostocorum* UAM 387 junto con otras secuencias de las bases de datos con un soporte de bootstrap elevado (99/100/90). El porcentaje de similitud entre ellas osciló entre el 97.9 y 98.6%. Próximo a éste, se encontró el grupo **H** perteneciente a otra cepa de *Leptolyngbya* identificada como *Leptolyngbya boryana* UAM 391. Este grupo de elevado soporte lo formaron secuencias con valores de similitud entre ellas de 98.9 a 99.9%. Aún así, las secuencias de *L. boryana* UAM 391 y *L. nostocorum* UAM 387 se

agruparon juntas en un grupo principal con valores de bootstrap altos tanto en NJ como en MP. Por último, se observó en la parte inferior del árbol el grupo **I** perteneciente al cultivo aislado identificado como *Pseudanabaena catenata* UAM 412 con un gran soporte. Los porcentajes de similitud entre las secuencias comparadas oscilaron entre el 97.7 y el 99.3%.

I.5. Discusión.

A la vista de los resultados presentados, podemos asegurar que la calidad físico-química del agua del río Guadarrama es mejor en el punto GU1, estando más deteriorada en GU2 y GU3, puntos en los que se obtuvieron valores más altos de muchos de los parámetros (especialmente N y P). Ese aumento de nutrientes puede ser debido tanto a vertidos agrícolas como de origen urbano.

Las elevadas concentraciones de fosfatos se suelen producir como consecuencia del uso de detergentes (Hartig y col., 1990) y, junto con otros compuestos procedentes de la actividad doméstica (amonio y materia orgánica), que deberían ser eliminados en las depuradoras. Sin embargo, por lo general éstas no disponen de sistemas eficientes de eliminación de fósforo y nitrógeno. En el río Guadarrama, como consecuencia de estas actividades (ya que como se ha dicho el río pasa por numerosos núcleos de población, recibiendo vertidos de numerosas depuradoras e incluso vertidos incontrolados) presenta un deterioro sustancial de la calidad del agua en lo correspondiente a estos parámetros en los puntos aguas abajo (GU2 y GU3). Este hecho se intensifica en verano, debido por una parte al aumento de la población y de las actividades recreativas en el río en esta época estival. Y debido, por otra parte, a la disminución del caudal, por lo tanto, el factor dilución disminuye aumentando la concentración de nutrientes. Con el paso de los años, la calidad del agua en el punto GU2 ha ido asemejándose a la del punto GU3, siendo a veces sus valores de concentración de nutrientes más altos, debido a una mayor contaminación.

Distintos autores clasifican las aguas corrientes en función del contenido en fósforo y nitrógeno, considerando aguas eutróficas a partir de 0.15 mg/l de fósforo total (Álvarez-Cobelas y col., 1992), y una concentración de 2.2 mg/l de nitrógeno total (Van Dijk y col., 1994). Kelly y Whitton (1998) elaboraron una clasificación más detallada que tiene en cuenta la concentración de fósforo reactivo de la siguiente manera:

- Oligotrófico: $PRS < 0.020$ mg/l.
- Mesotrófico: $0.02 < PRS < 0.1$ mg/l.
- Eutrófico: $0.1 < PRS < 0.5$ mg/l.
- Hipertrófico: $PRS > 0.5$ mg/l.

Según estas clasificaciones los puntos GU2 y GU3 estarían dentro de la categoría de eutrófico-hipertróficos, claramente diferenciados del punto GU1 que se clasifica como oligo-mesotrófico. Con estos valores podríamos considerar que el río Guadarrama es un río eutrofizado, al igual que la mayoría de los ríos europeos estudiados (van Dijk y col., 1994) y que el 60% de los ríos españoles (Álvarez-Cobelas y col. 1992). Hay que tener en cuenta que este estudio sólo abarca las medidas de cada uno de los parámetros en un periodo anual, y que por lo tanto no son datos suficientes como para diagnosticar la calidad del agua del río en términos generales. Por ello, y tomando como base a la hora de comparar resultados, se han tenido en cuenta estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación. En ellos se han estudiado la calidad del agua de otros ríos de la CAM (ríos Alberche, Manzanares, Jarama, Guadalix y Tejada) y, sobretodo, del Guadarrama que es el objeto de este estudio. En estos estudios anteriores, se han obtenido diferencias similares entre puntos altos y bajos (Perona y col., 1999; Sánchez-García, 2002; Douterelo y col., 2004; Rodríguez-Gómez, 2004).

Se puede decir que las características físico-químicas de las aguas muestran que el río Guadarrama presenta una fuerte eutrofización aguas abajo, siendo de hecho objetivo de la Confederación Hidrográfica del Tago de cara a mejorar la calidad de sus aguas. Uno de sus principales objetivos es disminuir las concentraciones de amonio y fósforo (Ministerio de Medio Ambiente, 1999), principales responsables de la eutrofización.

Los resultados obtenidos del estudio de la abundancia y estructura de la comunidad, indicaron que todas las cianobacterias identificadas en el río Guadarrama han sido descritas por otros autores en comunidades epilíticas de ríos de diversa naturaleza, en especial en ríos mediterráneos (Aboal, 1988; Sabater y col., 1987) y en otros ríos de la Comunidad de Madrid estudiados (Douterelo y col., 2004; Perona y col. 1999; Rodríguez-Gómez, 2004; Sánchez-García, 2002; Serrano y col., 2004; Carmona y col., 2011). Además, algunas de las especies observadas han sido descritas en ríos

Europeos de Noruega, Italia, Austria (Cantonati y col., 1996; Lidnström y Traaen, 1984; Rott y Pfister, 1988; Schneider y Lindstrøm, 2011).

La comunidad epilítica de ríos está compuesta por alrededor de 15 a 20 especies diferentes de cianobacterias tal como han mostrado numerosos estudios de esta comunidad. Estos datos concuerdan con los encontrados en el río Guadarrama, confirmando que trabajar con este grupo de microorganismos para estudio de calidad de aguas presenta la ventaja de ser un grupo menos numeroso que otros organismos epilíticos ampliamente utilizados en estudios de biomonitorización (Perona y col., 1998) como son las diatomeas, que presenta un número medio de especies más elevado (Sabater y col., 1987). Sin embargo este grupo de organismos presenta como desventaja la compleja taxonomía debido a lo antiguo y confuso de las claves taxonómicas encontrándose éstas en continua revisión. En el caso del epilíton de ríos, la identificación es si cabe más compleja debido a que, a veces, en el proceso de extracción del mismo se provoca la rotura de filamentos perdiéndose información. Aparecen generalmente células sueltas o fragmentos pequeños, perdiéndose muchos caracteres taxonómicos como la morfología de la colonia, la presencia o no de mucílago, las terminaciones de los filamentos, etc. imprescindibles para la caracterización.

A este respecto, el cultivo en medio sólido proporciona una herramienta sumamente útil de cara a la identificación debido a que permite obtener información de todas las características necesarias así como los diferentes estadios celulares si se consiguen las condiciones óptimas de crecimiento de las cianobacterias (Thiel y col., 1989) a pesar de que el cultivo puede provocar la aparición de polimorfismos tanto de las colonias como de filamentos y células. Algunos autores insisten en la inconveniencia de la identificación taxonómica de muestras de cultivo con las claves taxonómicas actuales al estar elaboradas a partir de muestras naturales (Anagnostidis y Komàrek, 1988). Sin embargo trabajos morfológicos en los que se comparan muestras naturales y en cultivo contribuyen a disminuir este inconveniente (Rippka y col., 1979; Perona y col., 2003; Mateo y col., 2011).

Por otra parte la identificación de las especies del género *Nostoc* se ha podido realizar gracias a que los cultivos han permitido obtener información de todas las características y estadios celulares sin los cuales habría sido imposible. Tan sólo una especie no han sido capaz de crecer en cultivo, habiendo sido descrita exclusivamente

en la muestra natural (*Chamaesiphon polymorphus*). Todo esto confirma que ambas técnicas son necesarias y complementarias pero nunca excluyentes.

Los valores de la riqueza específica obtenida del epilíton, permiten decir que las especies del orden Chroococcales como las Oscillatoriales son mayoritarias, presentando variaciones en cuanto a su distribución espacial debida a cambios en la calidad del agua. El número de especies en estos órdenes oscila entre 4 y 7, resultado similar al obtenido en otros estudios de ríos de la Comunidad de Madrid (Perona y col. 1999; Sánchez-García, 2002; Douterelo y col., 2004; Serrano y col., 2004), indicando que estos valores son típicos de la comunidad epilítica de estos ríos. El orden Nostocales es el que presenta menor número de especies sujetas además a mayor variabilidad estacional y con una clara disminución en los puntos aguas abajo. Nuestros resultados muestran una clara disminución de la riqueza específica a medida que se va deteriorando la calidad del agua del río Guadarrama al igual que se ha visto en otros ríos (Perona y col., 1998; Douterelo y col., 2004).

Unificando los resultados tanto de la química del agua como de la estructura y composición de la comunidad de cianobacterias encontradas en el río Guadarrama, nuestros resultados muestran claramente una disminución de la riqueza específica a medida que se va deteriorando la calidad del agua del río Guadarrama al igual que se ha visto en otros ríos (Perona y col., 1998; Douterelo y col., 2004). Aboal (1988) y Fernández-Piñas y colaboradores (1991), describieron algunas especies del género *Nostoc* como típicas de aguas no contaminadas. Estos mismos autores describieron que, cuando se produce un incremento de eutrofización en las aguas aumentan, de forma contraria a las Nostocales, algunas especies del orden *Oscillatoriales* (Rott y Pfister, 1988; Aboal, 1989).

Como se ha citado en la introducción, actualmente existe un índice basado en algas bentónicas para evaluar el estado trófico en ríos nórdicos (Schneider y Lindstrøm, 2011) según los valores de fósforo total en el medio. En él, se presenta un listado de cianobacterias bentónicas, donde se encuentran muchas de las cianobacterias encontradas en el río Guadarrama. Aquellas especies heterocistas pertenecientes al género *Nostoc* y *Tolypothrix* se encuentran en sitios oligotróficos con concentraciones de fósforo total muy bajos, como también, las especies *Pleurocapsa minor* y *Chroococcus minutus*. Mientras, las especies *Chamaesiphon polymorphus*, *Pseudanabaena catenata* y algunos *Phormidium* están presentes en condiciones de

concentraciones de fósforo medias y altas. Del género *Leptolyngbya* han registrado sólo tres especies y no coinciden con las especies encontradas en el río Guadarrama.

Otro abordaje realizado en este capítulo fue el análisis genético de aquellas cianobacterias que fueron aisladas del epilíton. En este apartado se han aislado y secuenciado el gen de ARNr 16S (1200 pb) de un total de doce cepas que forman parte de la comunidad epilítica de cianobacterias del río Guadarrama. Tanto el estudio morfológico de dichos aislados como los análisis genéticos de sus secuencias, han permitido identificar representantes de los órdenes Chroococcales, Oscillatoriales y Nostocales. Los resultados obtenidos del análisis filogenético, muestran que miembros pertenecientes a los órdenes Chroococcales y Oscillatoriales se encuentran dispersos dentro de los árboles filogenéticos, indicando que ambos órdenes no representan un linaje evolutivo coherente el cual indica un origen polifilético. Este resultado es congruente con aquellos encontrados en otros estudios (Turner y col. 1999; Castenholz, 2001; Taton y col., 2006a; Dorador, y col., 2008; Cuzman y col., 2010). En cuanto al orden Chroococcales, se identificaron cuatro cepas de géneros distintos.

En primer lugar, el aislado *Synechococcus elongatus* sp. UAM 406 se agrupó con cepas planctónicas de aguas dulces tanto del género *Synechococcus* como *Cyanobium*. También se consideran a algunas especies del género *Synechococcus* importantes componentes de los tapetes béticos de cianobacterias (O'Sullivan y col. 2002; Ward y col. 1998; Whitton, 2002) pero no se han encontrado secuencias en las bases de datos procedentes de ríos. Los resultados filogenéticos obtenidos coinciden con estudios realizados con numerosas cepas pertenecientes a dichos géneros (Ernst y col., 1995, 2003; Robertson y col., 2001; Sánchez-Baracaldo y col., 2008). Muchos estudios sostienen que los miembros incluidos dentro del género *Synechococcus* tienen un origen polifilético y deberían ser divididos en distintos géneros (Wilmotte, 1994; Urbach y col. 1998, Turner y col. 1999; Ernst y col., 2003). Rippka y Cohen-Bazire (1983) distinguieron tres tipos de *Cyanobium* a nivel de especie, pero sin descripciones taxonómicas válidas, y se sugiere una revisión exhaustiva de dicho género (Komárek y Anagnostidis, 1999).

En cuanto a la cepa aislada *Aphanocapsa muscicola* UAM 385 se agrupó con un gran soporte con secuencias de las bases de datos pertenecientes al género *Synechocystis*, principalmente de cepas procedentes de estudios realizados sobre interacciones planta-cyanobacteria, cuya morfología es muy similar con el aislado estudiado (Ahmed y col. 2010a, 2010b). Este aislado se ha identificado previamente en

otros estudios como parte de las comunidades epilíticas de cianobacterias en ríos (Douterelo y col., 2004; Perona y Mateo, 2006; Whitton, 2002), y como referencia en la Península Ibérica (Álvarez-Cobelas y Gallardo, 1988; Noguerol-Seoane, 1999; Asencio y Aboal, 2000). Existen pocas secuencias en las bases de datos identificadas con esta especie, sólo se han visto algunas procedentes de cepas encontradas en biofilms en fuentes monumentales (Cuzman y col. 2010; Uher, y col. 2005) y secuencias del mismo género, la mayoría proceden de cianobacterias planctónicas en lagos y embalses (Willame y col., 2006).

En relación al cultivo *Pleurocapsa minor* UAM 388, aparece agrupada con secuencias de cepas procedentes de ambientes extremos en desiertos (Fewer y col., 2002; Olsson- Francis, y col., 2010). Las similitudes de identidad de la cepa de estudio con respecto a las secuencias obtenidas de las bases de datos, son congruentes con las descripciones morfológicas de dichos aislados. Según la literatura, las especies pertenecientes al género *Pleurocapsa* pueden encontrarse en distintos ambientes, en su gran mayoría en ecosistemas de aguas dulces en sustratos rocosos (Aboal y col. 2002; Komárek y Anagnostidis, 1999; Whitton, 2002).

El aislado *Chamaesiphon investiens* sp. UAM 386 se agrupó, en su mayoría, con secuencias de clones de cianobacterias sin una identificación clara y con una cepa procedente de la colección de cultivos de cianobacterias Pasteur identificada como *Chamaesiphon subglobosus* (Turner, 1997). Apenas existen secuencias de este género en las bases de datos. A nivel ecológico, esta especie está descrita tanto epilítica como epilítica en estudios realizados en arroyos y en ríos oligo-mesotróficos (Rott y col., 1997; Douterelo y col., 2004).

En cuanto a los aislados pertenecientes al Orden Oscillatoriales, se detallan a continuación. Las secuencias de las dos cepas identificadas dentro del género *Leptolyngbya* aparecen ubicadas en un grupo principal, y a la vez incluidas en subgrupos independientes con un alto valor de bootstrap (Miura y Yokota, 2006; Cuzman y col. 2010). Considerando los resultados morfológicos y filogenéticos de ambas y los valores de homología en el ADN, se podrían considerar especies distintas. Los estudios de homología ADN-ADN se han empleado para medir el grado de relaciones entre los organismos con una similitud alta en la secuencia de ADNr 16S. Los organismos con más de un 70% de homología en el ADN, el cual es el valor límite para el reconocimiento de especie (Wayne y col., 1987), comparten normalmente más

del 97% de similitud del gen ARNr 16S (Stackebrandt y Goebel, 1994). Nuevas investigaciones han permitido elevar incluso el valor límite para definir una especie en un rango por encima del 98.7%-99% (Stackebrandt y Ebers, 2006). Aplicando dichos rangos de valores límite establecidos para el reconocimiento de especie, se puede decir que en el caso del grupo de *Leptolyngbya boryana* todas las secuencias podrían pertenecer a la misma especie. De hecho, se sugiere que tanto *L. foveolarum*, *L. tenerrina* y *L. angustata* podrían ser sinónimos de *L. boryana* (Cuzman y col., 2010; Miura y Yokota, 2006). En el caso de la cepa *Leptolyngbya nostocorum* las similitudes entre las secuencias son ligeramente más bajas y están identificadas como *L. frigida*. Este nombre se considera como un sinónimo de la especie *Pseudanabaena frígida* y, además, puede que estas especies contengan más ecotipos. Por lo tanto, la clasificación de ambos debe ser revisada (Komárek y Anagnostidis, 2005). Las comparaciones de morfología junto con las descripciones de las distintas cepas de la base de datos parecen apoyar los estudios genéticos encontrados. A la vista de estos resultados, el género *Leptolyngbya* podría ser monofilético tal y como se ha observado en otros estudios (Albertano y Kováčik 1994; Nelissen y col. 1996). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que cepas asignadas al género *Leptolyngbya* se han agrupado con otros miembros de los géneros *Oscillatoria* y *Phormidium* dentro del mismo grupo. Por lo tanto, se sugiere que el linaje filogenético de cepas del género *Leptolyngbya* no es monofilético (Turner y col. 1999; Marquardt y Palinska, 2007; Furtado y col. 2009). Ludwig y colaboradores (1998) han propuesto un valor límite de un 95% de similitud para la separación de géneros. De acuerdo con este límite, ambos genotipos de *Leptolyngbya* encontradas, se deberían corresponder con géneros distintos según sus valores de similitud de alrededor del 90%. Aún así, es necesario investigar en profundidad la taxonomía de estos miembros debido a las distintas nomenclaturas empleadas por distintos autores, lo cual puede generar confusiones e identificaciones incorrectas.

La heterogeneidad del género *Leptolyngbya* ha sido muy discutido por muchos autores (Albertano y Kováčik 1994; Wilmotte y col., 1997; Taton y col., 2003) entre otros, con la necesidad de más estudios para resolver este problema. Claramente este género es diferente al género *Phormidium* y probablemente será dividido en más entidades genéricas de acuerdo a los criterios genéticos (Komárek y Anagnostidis, 2005). Por otro lado, el género *Leptolyngbya* es uno de géneros más comunes y difíciles dentro de las cianobacterias, con numerosas especies de filamentos finos, los cuales son

morfológicamente muy sencillos. Además, miembros de este género se encuentran en una amplia variedad de ecosistemas, y por ello, es necesario incluir en los estudios fenotípicos sus características ecológicas (Komárek y Anagnostidis, 2005). A nivel ecológico, ambos aislados suelen encontrarse en ríos y arroyos (Whitton, 2002) y se han identificado en estudios de comunidades de cianobacterias en dichos ambientes dentro de la comunidad de Madrid (Douterelo y col., 2004; Perona y Mateo, 2006).

En cuanto al aislado identificado como *Phormidium* sp. UAM 361 se agrupó mayoritariamente con cepas identificadas como *Ph. autumnale* (Palinska y Marquardt, 2008). Esta especie parece encontrarse en sustratos rocosos principalmente en ríos y arroyos de carácter mesotrófico y eutrófico (Komárek y Anagnostidis, 2005; Whitton, 2002). *Phormidium* pertenece taxonómicamente a uno de los géneros más complejos dentro de las cianobacterias, y comprende numerosos morfotipos con muchas formas de transición (Komárek y Anagnostidis, 2005). La complejidad de este grupo se estudiará en profundidad más adelante.

Por último, dentro de este Orden encontramos el aislado *Pseudanabaena catenata* UAM 412, el cual aparece agrupado con secuencias de cepas pertenecientes al mismo género y en su mayoría de origen planctónico (Turner, 1999). En general, las distintas especies de *Pseudanabaena* se suelen encontrar en ambientes oligotróficos hasta eutróficos. También se han visto especies de este género en fuentes monumentales (Cuzma y col. 2010) como en comunidades bentónicas en ríos (Sabater y col. 2003; Douterelo y col., 2004; Perona y Mateo, 2006; Whitton, 2002). De hecho, se le considera un género muy heterogéneo tanto a nivel morfológico como ecológico (Komárek y Anagnostidis, 2005).

En cuanto a las cianobacterias con heterocistos (Orden Nostocales), son morfológicamente muy diversas y forman un grupo monofilético entre las cianobacterias, en base a las secuencias del gen ARNr 16S (Giovannoni y col., 1988; Lyra y col., 2001; Gugger y Hoffmann, 2004). Sin embargo, las relaciones entre las diferentes cianobacterias con heterocistos están en su mayoría sin resolver. Dentro del grupo formado por los aislados del Orden Nostocales, se pudieron diferenciar cuatro subgrupos con un elevado valor de bootstrap correspondiente a cada cepa. En primer lugar se encontraron los aislados *Nostoc piscinale* UAM 394 y *N. carneum* UAM 389 agrupados en distintos subgrupos (grupos I y II, respectivamente) pero muy cercanos, con secuencias en su mayoría de cianobacterias simbióticas del mismo género, como

también aislados de lagos y suelos. La separación de dichos aislados también apoya las diferencias morfológicas encontradas entre ambos. Tanto la topología de este grupo como la morfología de las cepas de estudio, coinciden con los resultados observados en estudios previos (Elvebakk y col., 2008; Oksanen y col., 2004; Papaefthimiou y col. 2008). Ambas cepas aparecen emparentadas con una secuencia de una cepa identificada como *Nostoc calcicola*. En los estudios citados anteriormente, se sugiere que, a pesar de compartir caracteres morfológicos con *N. calcicola* (Hrouzek y col. 2003), se considera que dicho grupo es todavía muy heterogéneo, como es demostrado también al verse separados los dos grupos de cepas (grupos I y II) en dos grupos independientes (Papaefthimiou y col. 2008; Mateo y col., 2011). En una posición más alejada se encuentra la cepa *N.punctiforme* UAM 393 de características morfológicas diferenciadas. Muy cercano a este aislado, se encontró la cepa de género distinto *Tolypothrix penicillata* UAM 392. Dentro del grupo principal (grupo I) se encontraron cepas del género *Anabaena* y *Trichormus* con un alto valor de bootstrap. En estudios filogenéticos recientes, usando distintos genes marcadores moleculares, se demostró que los géneros más cercanos al género *Nostoc* son los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon* y *Trichormus*, también miembros de la familia Nostocaceae (Henson y col., 2002; Lohtander y col., 2003; Rajaniemi y col., 2005; Svenning y col., 2005). La presencia de todas las cepas heterocistas aisladas en este estudio se ha descrito también en diversos estudios de comunidades de cianobacterias bentónicas en ríos españoles (Aboal y col. 2002; Douterelo y col., 2004; Mateo y col., 2006; Perona y col., 2006).

II. Bioensayos con especies de cianobacterias potencialmente bioindicadoras

II. BIOENSAYOS CON ESPECIES DE CIANOBACTERIAS POTENCIALMENTE BIOINDICADORAS.

II.1. Introducción.

Existen numerosos factores que influyen en el crecimiento de las especies bentónicas, así como, en la aparición de fenómenos de dominancia en el medio ambiente. Uno de estos factores es la distinta capacidad que tiene cada una de ellas de absorción y utilización de nutrientes necesarios para un crecimiento óptimo y de tolerar determinadas condiciones ambientales como es la elevada concentración de distintos compuestos. La presencia de elevadas concentraciones de nitrógeno y fósforo en aguas superficiales, son producidas en su mayoría por diversas actividades antrópicas (Fujimoto y Sudo, 1997; Neal y col., 2010). Como consecuencia, se han descrito cambios en la diversidad de las comunidades biológicas en respuesta a esas condiciones en ecosistemas acuáticos, siendo la mayoría de estudios en lagos y embalses (Sommer, 1985; Suttle y col., 1987; Smith y col., 1999; Klug, 2006; Zhu y col., 2010). En lo que respecta a ríos, la entrada de nutrientes también puede alterar la composición de las comunidades bentónicas, por ejemplo favoreciendo el crecimiento de algas y cianobacterias (Veraart y col., 2008; Sabater y col., 2000, 2003) y causando situaciones de prevalencia de ciertos taxones (Whitton y Kelly, 1995).

Son pocos los estudios ecofisiológicos basados en bioensayos con distintos regímenes de nutrientes en cianobacterias bentónicas en ríos (Van der Griten y col., 2004; Marcarelli y Wurtsbaugh, 2006; Vis y col., 2008), encontrándose mayoritariamente trabajos con especies fitoplanctónicas en embalses y lagos (Fujimoto y Sudo, 1997; Ducobu y col., 1998; Vézic y col., 2002; Camacho y col. 2003; Ernst y col., 2005; Shen y Song, 2007) e incluso con otras microalgas como diatomeas y algas verdes (Pasternak y col., 2009). En la mayoría de los estudios, los experimentos realizados se basan en tratamientos con nutrientes pero con pocas combinaciones en las concentraciones utilizadas para el N y el P (Blomqvist y col., 1994; Choi y col., 2003; Camacho, y col., 2003; Kruskopf y Du Plessis, 2006; Shen y Song, 2000), a diferencia de otros trabajos que aplicaron rangos más amplios de N y P, que permitieron establecer condiciones óptimas de crecimiento en los organismos con mayor precisión (Sivonen, 1990; Vézic y col., 2002; Ernst y col. 2005; Zhu y col., 2010). También estudios realizados con dichos nutrientes por separado, sugirieron que las respuestas a ambos no tienen por qué ser idénticas (Mitrovic y col., 2001; Elser y col. 2007). Elser y

colaboradores (2007) observaron que en productores primarios, tanto en ambientes terrestres como en aguas dulces, los tratamientos con P y N por separado mostraron resultados similares, no así en ambientes marinos. Por otra parte, Camacho y colaboradores (2003) observaron que concentraciones elevadas de N aumentaron la abundancia de cianobacterias fitoplanctónicas en bioensayos llevados a cabo en lagos, mientras que en los regímenes de P el efecto fue menor. En cambio, también se observó que la adición conjunta de elevadas concentraciones de N y P estimula en mayor proporción el crecimiento de cianobacterias, en concreto en especies no fijadoras de nitrógeno atmosférico, que si sólo se tratase de uno de los nutrientes (Blomqvist y col., 1994; Mitrovic y col. 2001; Camacho y de Wit, 2003).

Como ya se ha visto en estudios previos, existen cambios en la estructura y composición de comunidades de cianobacterias bentónicas en ríos debido a un gradiente de eutrofización (Perona y col., 1998, 1999; Douterelo y col. 2004; Perona y Mateo, 2006; Rodríguez y col., 2007). En el caso de las cianobacterias, la presencia, ausencia o el incremento de la abundancia de algunas especies, podrían definir las características del agua donde se encuentran, debido a las distintas exigencias ecológicas que presentan dichos organismos. Por ello se hace necesario estudiar en profundidad los patrones de crecimiento en distintas condiciones de nutrientes en aquellas especies de cianobacterias bentónicas que difieren en su presencia o abundancia, estableciendo relaciones causales que explicasen los resultados obtenidos en el capítulo anterior.

II.2. Estudio de competencia en sustrato artificial.

Una vez analizada previamente la composición y estructura de la comunidad de cianobacterias existente en el río Guadarrama, se seleccionaron nueve especies que *a priori* mostraron un carácter bioindicador de determinadas calidades del agua, y además, se hubiese conseguido su aislamiento.

Basándonos en la agrupación de las especies según su tolerancia a la contaminación, se seleccionaron las siguientes especies para el experimento: *Tolypothrix penicillata*, *Nostoc carneum* (Tabla 13 y Fig. 17 del capítulo I), *Phormidium* sp., *Leptolyngbya boryana*, *Leptolyngbya nostocorum*, *Pseudanabaena catenata* (Tabla 12 y Fig. 16 del capítulo I), *Aphanocapsa muscicola*, *Synechococcus elongatus* y *Pleurocapsa minor* (Tabla 11 y Fig. 15 del capítulo I). Las dos primeras son fijadoras de nitrógeno y las siete especies restantes carecen de los mismos.

En primer lugar, las cianobacterias fueron sometidas a un experimento de competencia donde crecieron las nueve especies en las mismas condiciones y en el mismo sustrato, según se indica en el apartado IV.4.1 de *Materiales y métodos*. La estimación del crecimiento de cada una de las especies se realizó midiendo la superficie ocupada en la placa en los dos medios de cultivo a los 10 y 20 días del inicio del experimento.

En este experimento se distinguieron dos grupos de cianobacterias en función de su crecimiento en los dos medios: aquellas especies que dominan en un medio en concreto, o aquellas que crecen indistintamente en ambos medios (Fig. 23 y Fig. 24). En la placa de medio rico en nutrientes (Allen y Arnon, AAN,) predominaron a los 10 días las especies *Nostoc carneum*, *Phormidium* sp., seguido de *Aphanocapsa muscicola* y *Pseudanabaena catenata*. A los 20 días, se observó cómo *Phormidium* sp. fue la especie dominante con un 58% de la superficie total colonizada, seguida de *Synechococcus elongatus* con un 15.7%, *Pseudanabaena catenata* con un 9.3% y *Nostoc carneum* con un 7.6%.

En la placa de medio pobre en nutrientes (CHU₁₀D) se observó también un grupo de especies dominantes en estas condiciones. Así, la estimación de la superficie colonizada a los 10 días (Fig. 24) confirmó un crecimiento superior de *Tolypothrix penicillata*, seguida de *Nostoc carneum* y por último de *Leptolyngbya nostocorum*. A los 20 días, *Tolypothrix penicillata* volvió a presentar un crecimiento superior con un 49.5% de la superficie total colonizada, seguida de *Nostoc carneum* con un 39.6% y en este último caso, la especie *Pleurocapsa minor* con un 3%.

Como se ha comentado antes, existe un grupo de cianobacterias que crecieron indistintamente en ambos medios sin presentar una dominancia clara. Es el caso de las especies *Leptolyngbya nostocorum* y *Leptolyngbya boryana*, las cuales mostraron un crecimiento similar tanto a los 10 como a los 20 días, con una superficie del 1.5-1.9 % en AAN, y del 2-2.25% de la superficie total colonizada en CHU₁₀D. La especie *Aphanocapsa muscicola* fue la que mostró valores intermedios de crecimiento en ambas placas con respecto a las demás, con un valor de 2.1% en AAN y de 0.18% en CHU₁₀D, creciendo en mayor proporción en el medio rico en nutrientes.

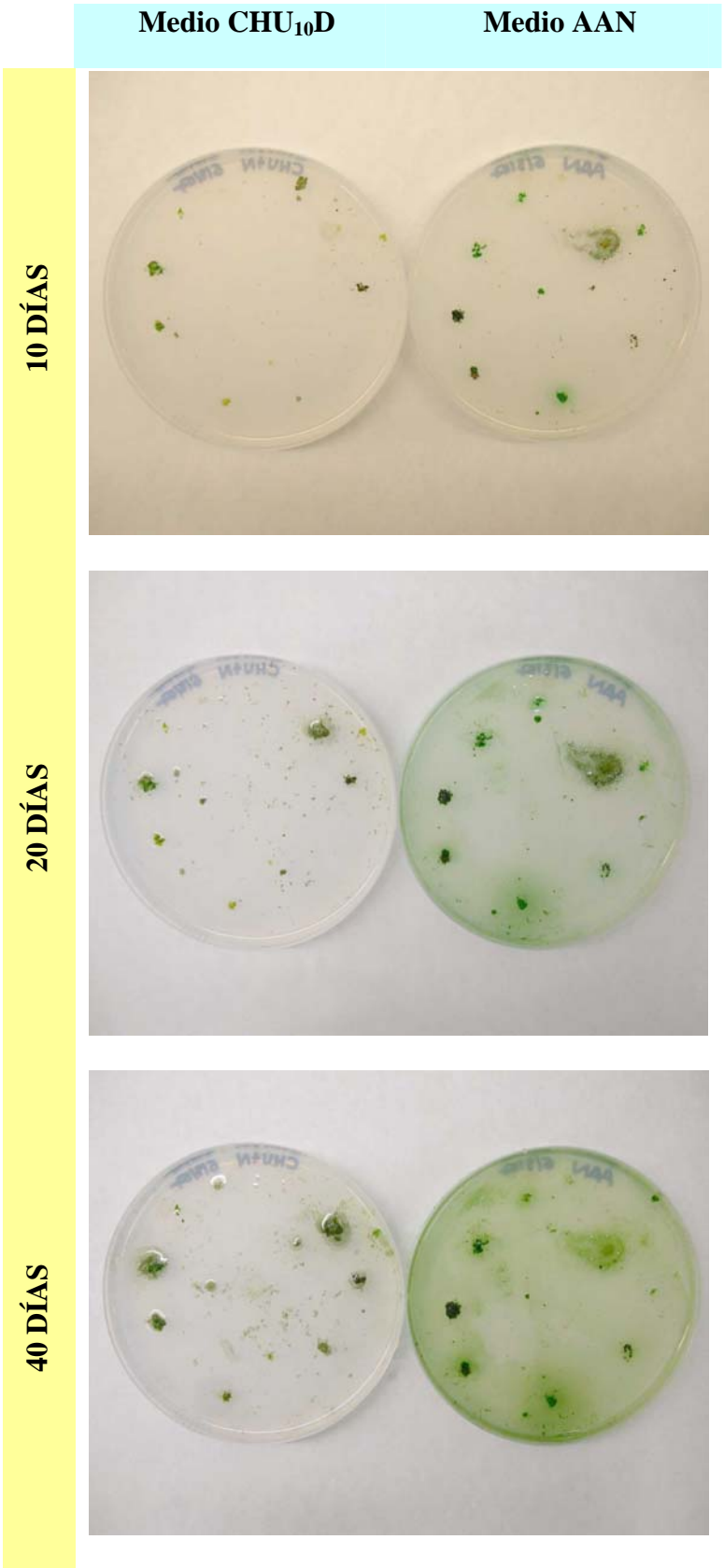


Figura 23. Aspecto de las placas inoculadas con las diez especies citadas tras 10, 20 y 40 días de crecimiento.

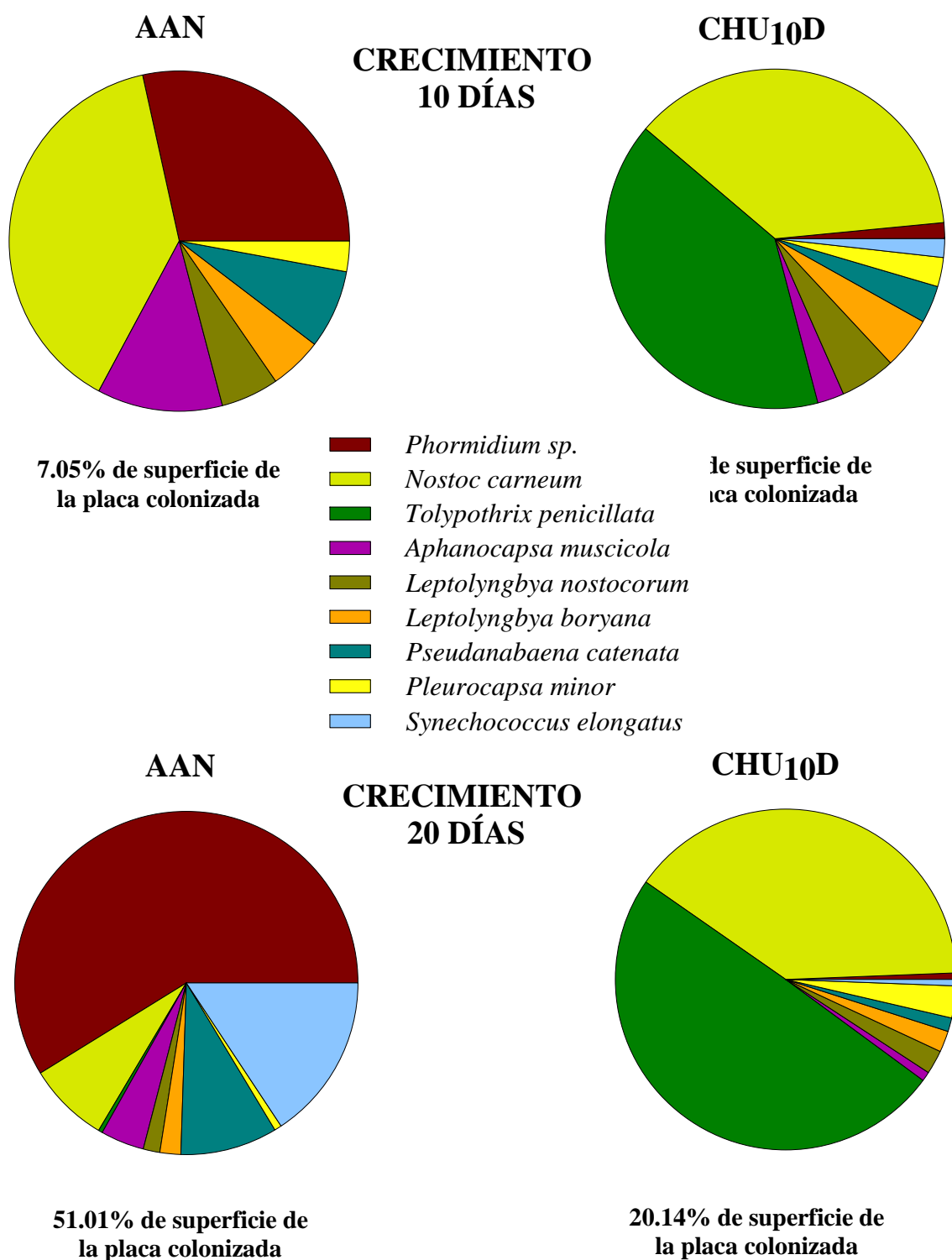


Figura 24. Comparación de la superficie de placa colonizada por las distintas especies estudiadas en los medios Allen y Arnnon (AAN) y CHU₁₀D tras 10 y 20 días de crecimiento.

Por último, se tomaron fotografías de las placas a los 40 días del inicio del experimento (Fig. 23), en las que se puede observar el contraste en el crecimiento entre las distintas especies, aunque no fue posible calcular la superficie ocupada por cada una debido a los solapamientos entre especies (excesiva densidad de biomasa en AAN). Se vio el mismo crecimiento en todas las especies, con un claro predominio de *Phormidium* sp. por toda la placa en el medio AAN. En cambio, *Tolypothrix penicillata* fue la especie dominante en el medio CHU₁₀D.

Con el fin de profundizar en el estudio de estas especies, se seleccionaron cuatro de ellas, escogiendo aquellas especies que habían dominado en un medio en concreto como *Phormidium* sp. (en el medio AAN) y *Tolypothrix penicillata* (en el medio CHU₁₀D). Y en segundo lugar, aquellas especies que habían crecido en ambos medios como las especies *Nostoc carneum* y *Leptolyngbya boryana* en menor proporción.

En la figura 25 se muestra el resultado del crecimiento diferencial de las cuatro especies seleccionadas. En el medio CHU₁₀D, se observó a los 10 días un crecimiento notable de la especie *Tolypothrix penicillata* con una colonización del 41% del total de la placa. En segundo lugar, se encuentra *Nostoc carneum* con una superficie ocupada de 34%, seguida de *Phormidium* sp. y *Leptolyngbya boryana*. A los 20 días, se observó la misma tendencia creciente, donde *Tolypothrix penicillata* dominó claramente con una superficie del 53%, seguida de *Nostoc carneum* con un 25%, y *Phormidium* sp. y *Leptolyngbya boryana* en último lugar con un ligero aumento.

Sin embargo, en el medio AAN la especie que dominó a los 10 días fue *Phormidium* sp. con un 43%, seguida de *Leptolyngbya boryana* y *Tolypothrix penicillata* con valores similares de 26% y 21% respectivamente. Por último, *Nostoc carneum* presentó un porcentaje mínimo de 8%. A los 20 días, *Phormidium* sp. dominó en placa con una extensión de superficie total colonizada del 74%, dejando al margen a las demás, dentro de la misma tendencia de crecimiento, con valores inferiores al 14%.



Figura 25. Comparación de la superficie de placa colonizada por las distintas especies estudiadas en los medios AAN y CHU₁₀D tras 10 y 20 días de crecimiento.

II.3. Bioensayos de competencia en un gradiente de nutrientes.

En función de los resultados obtenidos y con el fin de profundizar en el estudio de respuesta de las distintas cianobacterias a distintas concentraciones de nutrientes, así como, el efecto que ésta podía tener a nivel de competencia, se llevaron a cabo una serie de bioensayos en un gradiente de nutrientes durante 20 días, tal y como se muestra en el apartado IV.4.2 de *Materiales y Métodos*. En estos experimentos, las especies se han dividido en parejas en función de su comportamiento en placa, ya sea por dominar en un medio en concreto, o por crecer en ambos, tal y como se comenta anteriormente.

II.3.1. Efectos de las diferentes concentraciones de amonio en el crecimiento de las especies.

El análisis de crecimiento a las distintas concentraciones se realizó tanto en lupa como en microscopio. En el análisis a la lupa se comprobó que el crecimiento de *Phormidium* sp. y *Leptolyngbya boryana* iba en aumento según aumentaba el gradiente de concentraciones, mientras que en el caso de *Tolypothrix penicillata* y *Nostoc carneum*, ocurrió lo contrario.

Una vez realizado el recuento de células en las muestras de cada uno de los pocillos, se confirmó lo observado anteriormente a la lupa. En el caso de la especie *Phormidium* sp. (Fig. 26), se observó un incremento significativo en el crecimiento (ANOVA, $p < 0.01$) según van aumentando las concentraciones de amonio, alcanzando una biomasa superior a $4 \cdot 10^6$ células mL^{-1} . A bajas concentraciones (0.2 mg L^{-1}) la cantidad de células fue similar a la del inóculo inicial. *Leptolyngbya boryana* (Fig. 29) presentó la misma tendencia que *Phormidium* sp. pero con una ligera disminución de biomasa en la concentración de 100 mg L^{-1} . El crecimiento de ambas fue mayor a altas concentraciones de amonio (diferencias significativas, ANOVA $p < 0.01$). Sin embargo, en las especies *Tolypothrix penicillata* (Fig. 27) y *Nostoc carneum* (Fig. 30), el crecimiento es mayor a bajas concentraciones siendo su mayor producción de biomasa de $2.3 \cdot 10^6$ células mL^{-1} , observándose una paulatina reducción en el crecimiento según aumenta la concentración en el medio de cultivo (diferencias significativas, ANOVA $p < 0.01$).

En cuanto a los casos de competencia entre especies, se observaron claramente dos tendencias inversas en el crecimiento de las especies (Fig. 28 y Fig. 31). Por una parte, *Tolypothrix penicillata* dominó con respecto a *Phormidium* sp. a bajas concentraciones ($0.2\text{-}3 \text{ mg L}^{-1}$), mientras que a concentraciones superiores a 6 mg L^{-1} dominó esta última. Esta relación entre estas especies se repitió de igual manera entre las especies *Nostoc carneum* y *Leptolyngbya boryana*. Por último, destacar que en las cuatro especies la biomasa generada en las concentraciones más bajas (0.2 mg L^{-1} en *Phormidium* sp. y *L. boryana* y 100 mg L^{-1} en *T. penicillata* y *N. carneum*) es similar al inóculo inicial, dándose una inhibición del crecimiento. Las diferencias en el crecimiento entre las especies bajo el gradiente de concentraciones de amonio fueron significativas (ANOVA, $p < 0.01$).

Crecimiento de *Phormidium* sp.
en distintas concentraciones de NH_4^+

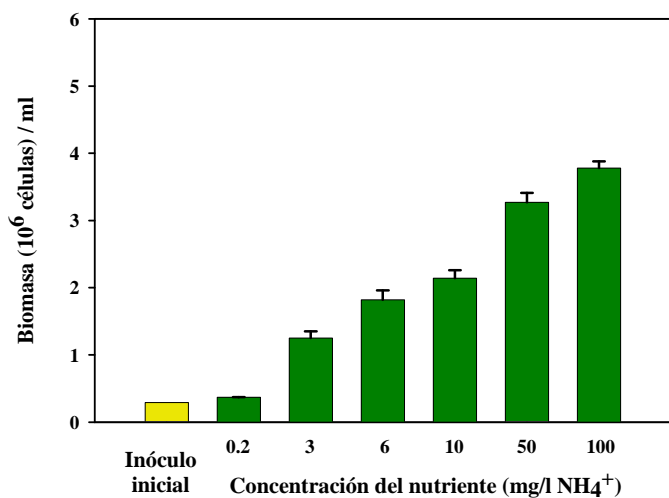


Figura 26. Evolución de la biomasa de *Phormidium* sp. en distintas concentraciones de amonio.

Crecimiento de *Tolypothrix penicillata*
en distintas concentraciones de NH_4^+

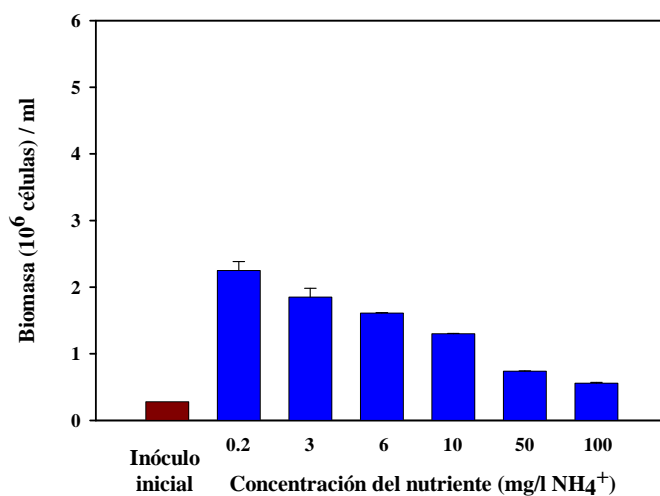


Figura 27. Evolución de la biomasa de *Tolypothrix penicillata* en distintas concentraciones de amonio.

Crecimiento de la mezcla de *Phormidium* sp.
y *Tolypothrix penicillata* en distintas concentraciones de NH_4^+

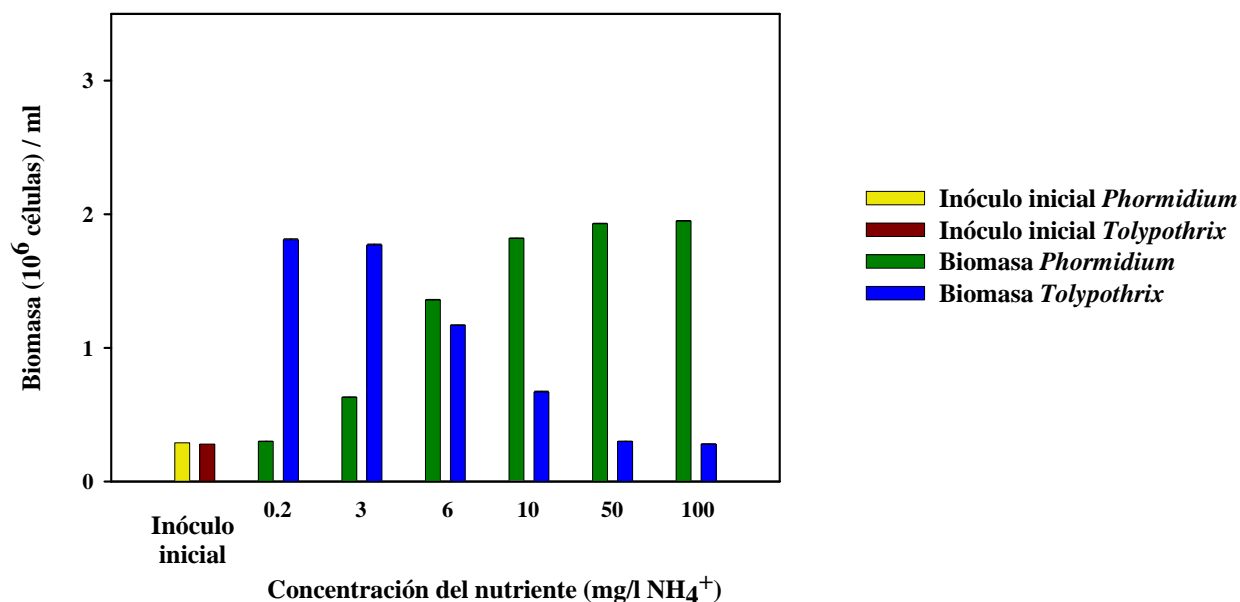


Figura 28. Evolución de la biomasa de la mezcla de *Phormidium* sp. y de *Tolypothrix penicillata* en distintas concentraciones de amonio.

Crecimiento de *Leptolyngbya boryana*
en distintas concentraciones de NH_4^+

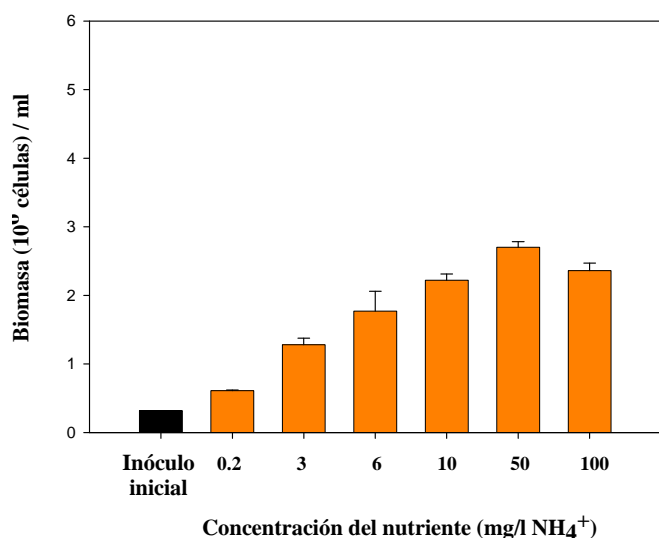


Figura 29. Evolución de la biomasa de *Leptolyngbya boryana* en distintas concentraciones de amonio.

Crecimiento de *Nostoc carneum*
en distintas concentraciones de NH_4^+

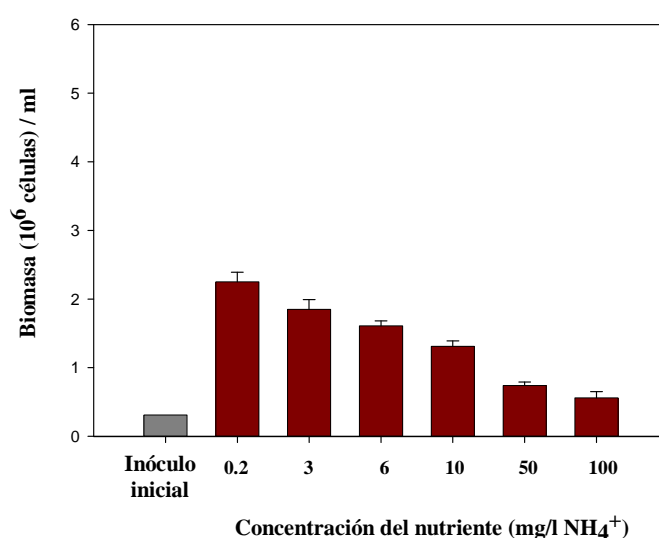


Figura 30. Evolución de la biomasa de *Nostoc carneum* en distintas concentraciones de amonio.

Crecimiento de la mezcla de *Leptolyngbya boryana*
y *Nostoc carneum* en distintas concentraciones de NH_4^+

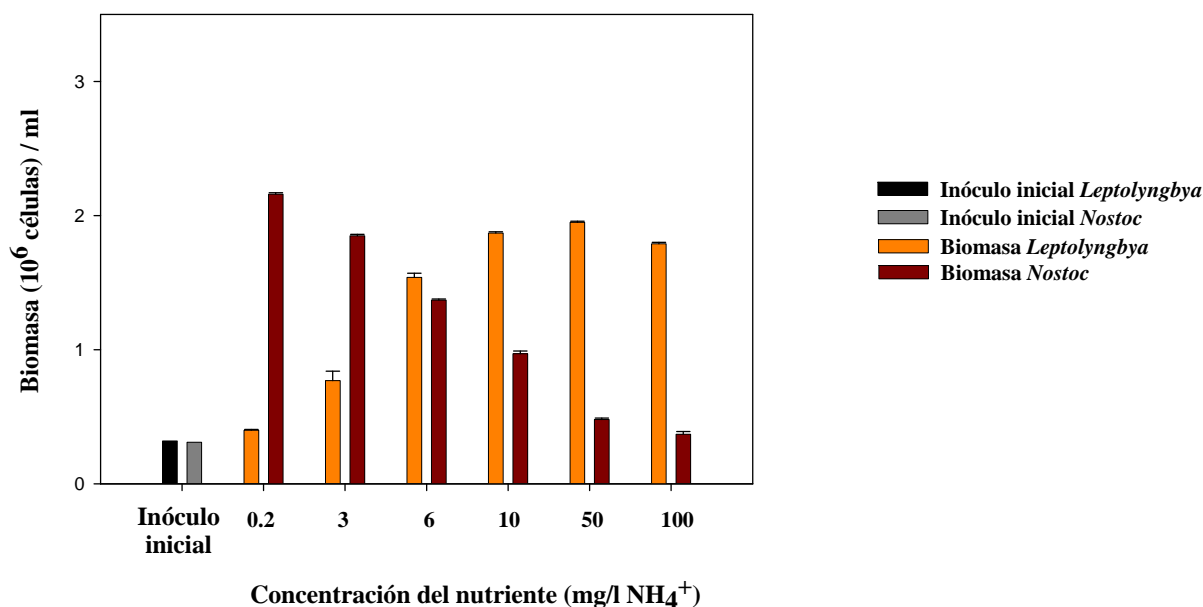


Figura 31. Evolución de la biomasa de la mezcla de *Leptolyngbya boryana* y de *Nostoc carneum* en distintas concentraciones de amonio.

II.3.2. Efectos de las diferentes concentraciones de nitrato en el crecimiento de las especies.

En el recuento microscópico de cada especie por separado, se observó de nuevo que el crecimiento se incrementaba según aumentaban las concentraciones de nitrato en el medio, tanto en *Phormidium* sp. (Fig. 32) como en *L. boryana* (Fig. 35), pero más atenuado en la primera, con una biomasa máxima ligeramente superior con $5 \cdot 10^6$ células mL^{-1} . El inóculo inicial no varió en la concentración de 0.2 mg L^{-1} de NO_3^- siendo mínima la capacidad de crecimiento de ambas especies a esta concentración. Sin embargo, *N. carneum* (Fig. 36), decreció según se aumentaban las concentraciones de nitrato en el medio (diferencias significativas, ANOVA $p < 0.01$). En *T. penicillata* (Fig. 33) no se encontraron grandes diferencial en el crecimiento a las distintas concentraciones ensayadas, salvo un ligero incremento encontrado a altas concentraciones (diferencias significativas, ANOVA $p < 0.01$).

En competencia entre especies, se encontraron de nuevo dos tendencias inversas en el crecimiento (Fig. 34 y Fig. 37), como ocurría en el caso anterior. En las gráficas, se observó un mayor crecimiento de *T. penicillata* y *N. carneum* a bajas concentraciones de nitrato, dominando en estas condiciones frente a *Phormidium* sp. y *L. boryana* (diferencias significativas, ANOVA $p < 0.01$). Al contrario, estas dos últimas especies crecieron en mayor medida a altas concentraciones donde su crecimiento fue óptimo (aunque en menor medida en *L. boryana*) (diferencias significativas, ANOVA $p < 0.01$).

II.3.3. Efectos de las diferentes concentraciones de fosfato en el crecimiento de las especies.

Los resultados del recuento de células de *Phormidium* sp. (Fig. 38) y *L. boryana* (Fig. 41), mostraron un crecimiento progresivo de la biomasa hasta un máximo de $3.1 \cdot 10^6$ y $2.8 \cdot 10^6$ células mL^{-1} respectivamente, el cual se alcanza en la concentración de 10 mg L^{-1} de PO_4^{3-} , disminuyendo significativamente entre 50 y 100 mg L^{-1} (ANOVA $p < 0.01$). En los experimentos con los otros nutrientes, la mayor biomasa de estas especies se alcanzó en la concentración máxima de 100 mg L^{-1} . Sin embargo en el caso del fosfato, el crecimiento a 100 mg L^{-1} no sobrepasó $0.3 \cdot 10^6$ células, valor similar al del inóculo inicial.

Crecimiento de *Phormidium* sp.
en distintas concentraciones de NO_3^-

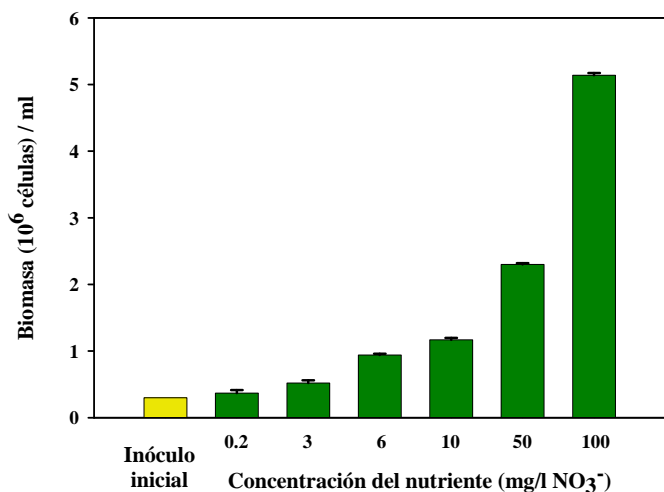


Figura 32. Evolución de la biomasa de *Phormidium* sp. en distintas concentraciones de nitrato.

Crecimiento de *Tolypothrix penicillata*
en distintas concentraciones de NO_3^-

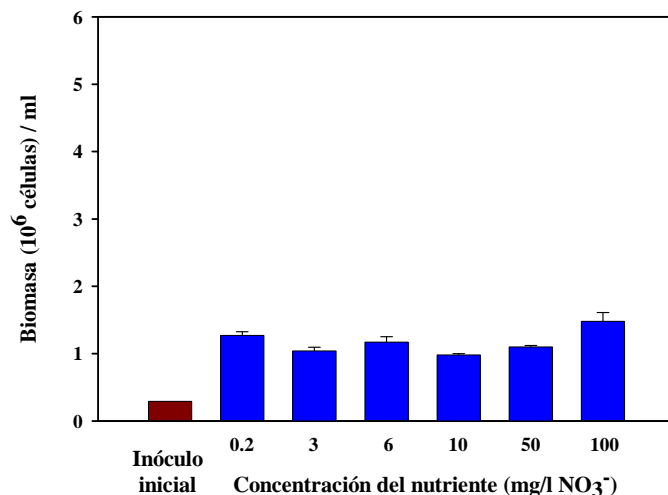


Figura 33. Evolución de la biomasa de *Tolypothrix penicillata* en distintas concentraciones de nitrato.

Crecimiento de la mezcla de *Phormidium* sp.
y *Tolypothrix penicillata* en distintas concentraciones de NO_3^-

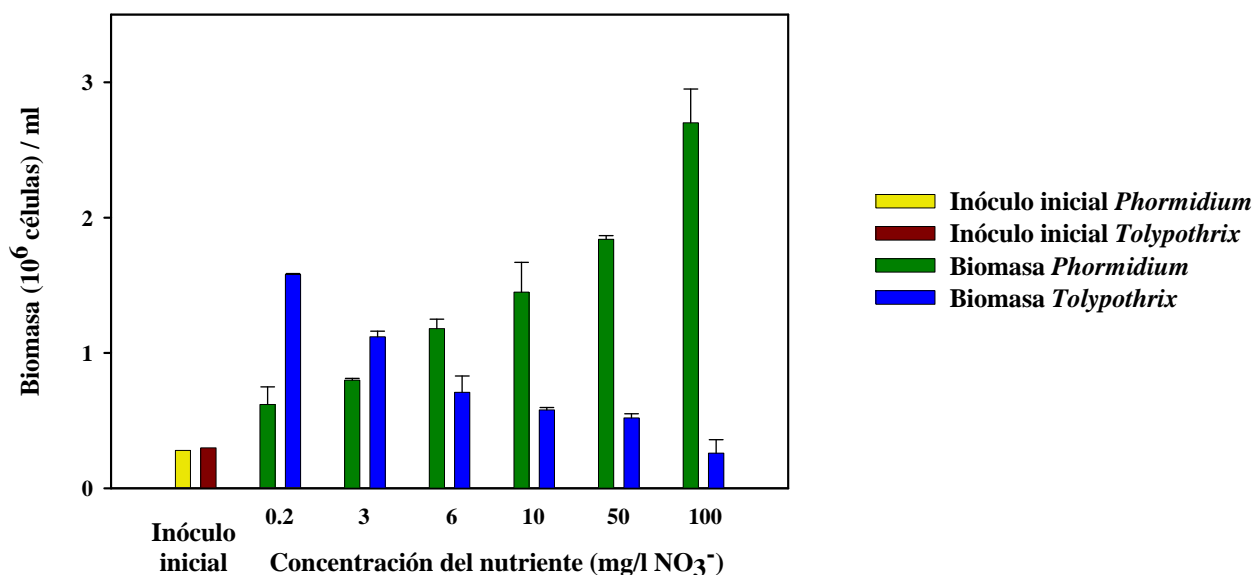


Figura 34. Evolución de la biomasa de la mezcla de *Phormidium* sp. y de *Tolypothrix penicillata* en distintas concentraciones de nitrato.

Crecimiento de *Leptolyngbya boryana* en distintas concentraciones de NO_3^-

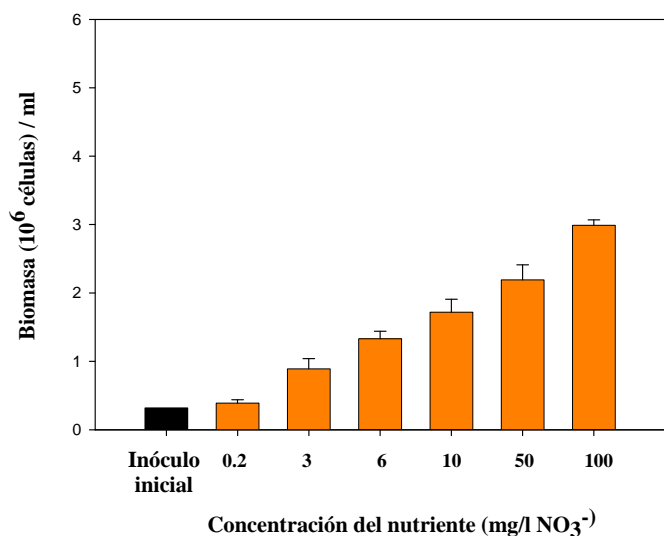


Figura 35. Evolución de la biomasa de *Leptolyngbya boryana* en distintas concentraciones de nitrato.

Crecimiento de *Nostoc carneum* en distintas concentraciones de NO_3^-

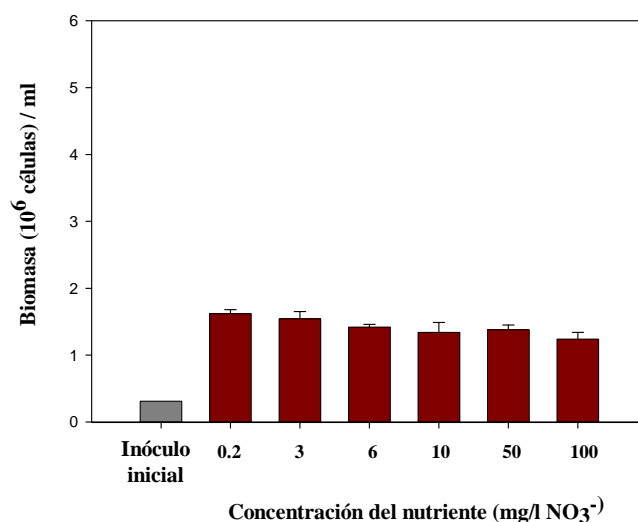


Figura 36. Evolución de la biomasa de *Nostoc carneum* en distintas concentraciones de nitrato.

Crecimiento de la mezcla de *Leptolyngbya boryana* y *Nostoc carneum* en distintas concentraciones de NO_3^-

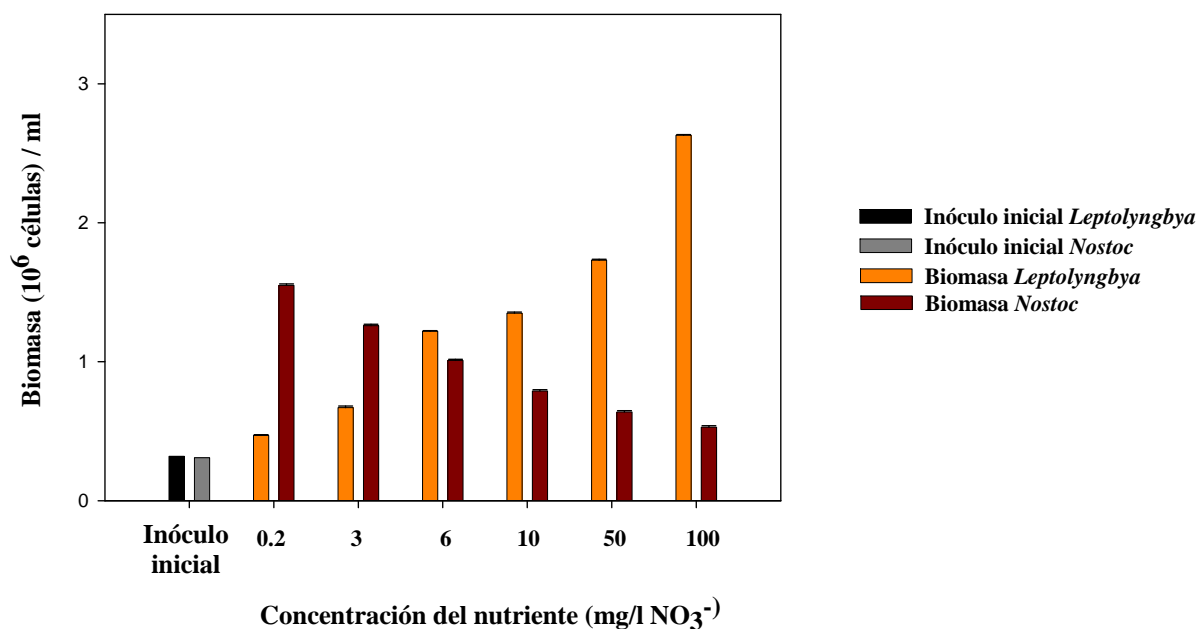


Figura 37. Evolución de la biomasa de la mezcla de *Leptolyngbya boryana* y de *Nostoc carneum* en distintas concentraciones de nitrato.

Crecimiento de *Phormidium* sp.
en distintas concentraciones de PO_4^{3-}

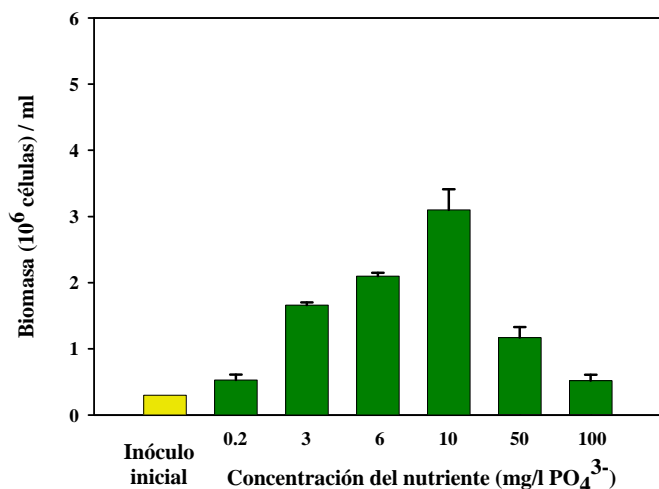


Figura 38. Evolución de la biomasa de *Phormidium* sp. en distintas concentraciones de fosfato.

Crecimiento de *Tolypothrix penicillata*
en distintas concentraciones de PO_4^{3-}

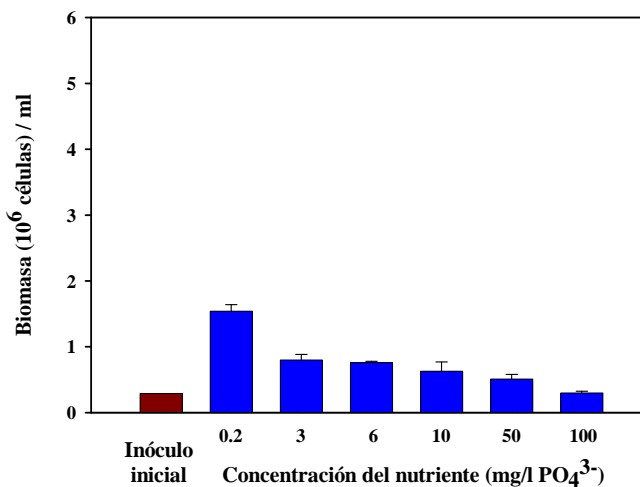


Figura 39. Evolución de la biomasa de *Tolypothrix penicillata* en distintas concentraciones de fosfato.

Crecimiento de la mezcla de *Phormidium* sp.
y *Tolypothrix penicillata* en distintas concentraciones de PO_4^{3-}

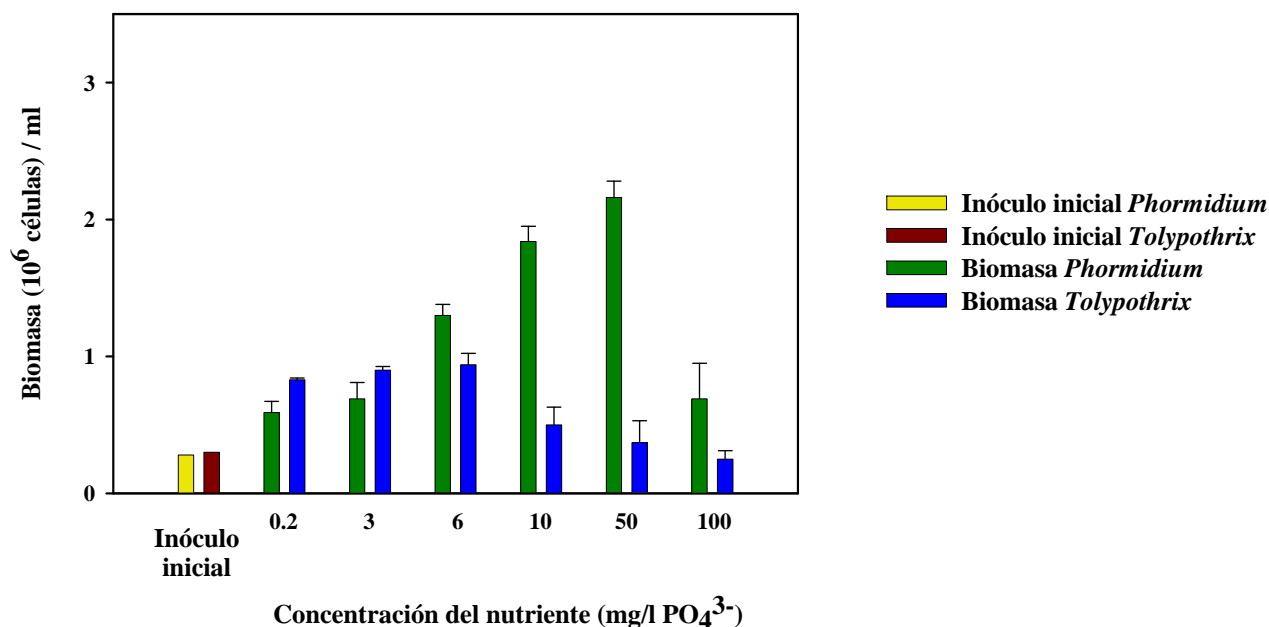


Figura 40. Evolución de la biomasa de la mezcla de *Phormidium* sp. y de *Tolypothrix penicillata* en distintas concentraciones de fosfato.

Crecimiento de *Leptolyngbya boryana* en distintas concentraciones de PO_4^{3-}

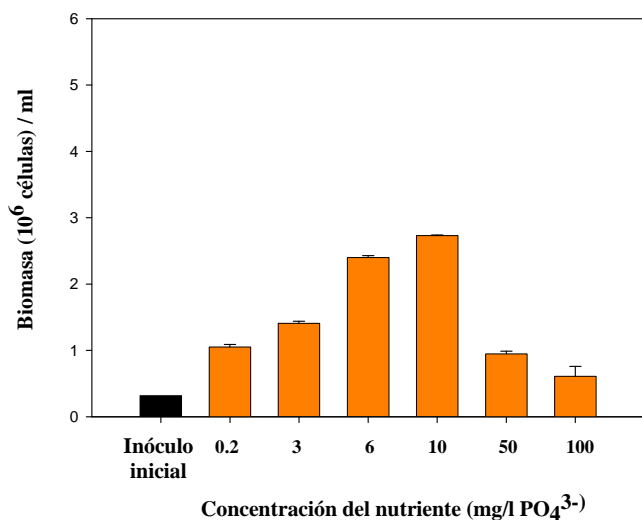


Figura 41. Evolución de la biomasa de *Leptolyngbya boryana* en distintas concentraciones de fosfato.

Crecimiento de *Nostoc carneum* en distintas concentraciones de PO_4^{3-}

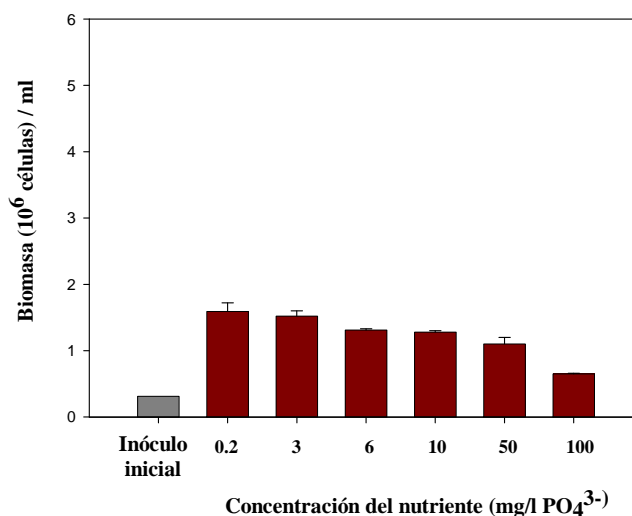


Figura 42. Evolución de la biomasa de *Nostoc carneum* en distintas concentraciones de fosfato.

Crecimiento de la mezcla de *Leptolyngbya boryana* y *Nostoc carneum* en distintas concentraciones de PO_4^{3-}

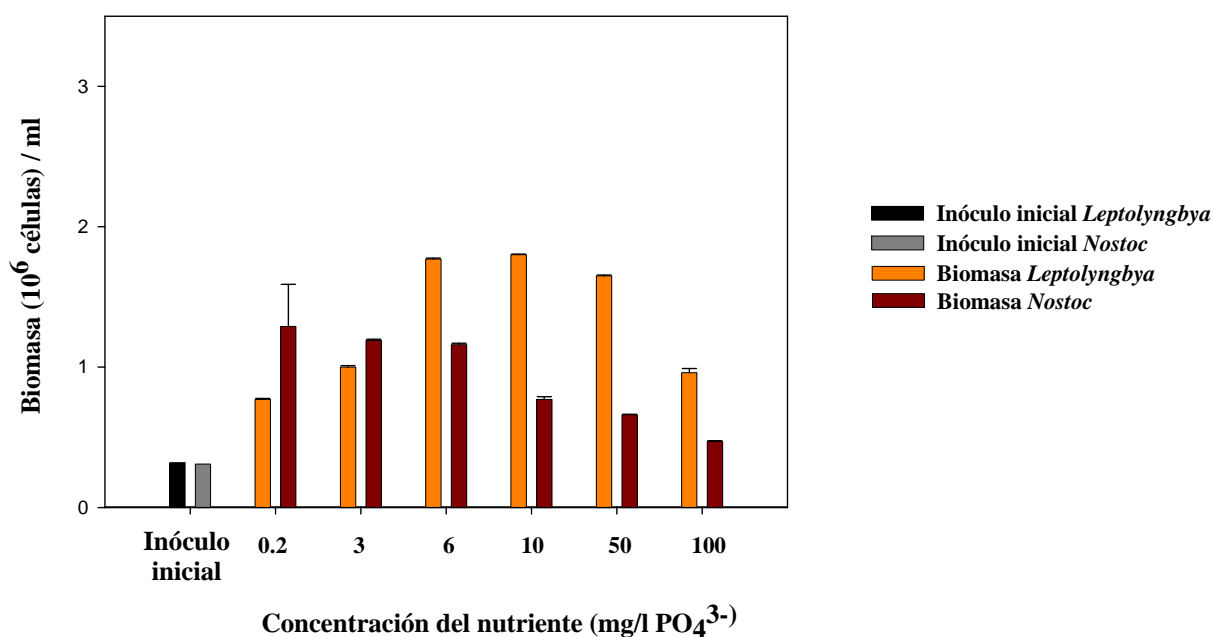


Figura 43. Evolución de la biomasa de la mezcla de *Leptolyngbya boryana* y de *Nostoc carneum* en distintas concentraciones de fosfato.

De estos datos se deduce que aumentos en la concentración de fosfatos provocaron incrementos en el crecimiento de la biomasa hasta alcanzar su máximo en 10 mg L^{-1} , momento a partir del cual sucesivos incrementos en la concentración causaron una inhibición del crecimiento. En el caso de *T. penicillata* (Fig. 39) y *N. carneum* (Fig. 42) se dio una disminución de la biomasa al aumentar la concentración de fosfato (diferencias significativas, ANOVA $p < 0.01$), estando el máximo ligeramente por encima de $1.5 \cdot 10^6 \text{ células mL}^{-1}$. En la concentración de 100 mg L^{-1} , la biomasa fue similar a la del inóculo inicial.

En el experimento de competencia (Fig. 40 y Fig. 43), *Phormidium* sp. y *Leptolyngbya boryana* mostraron una tendencia creciente, alcanzando el máximo de biomasa a 50 y 10 mg L^{-1} de fosfato respectivamente, produciéndose una disminución del crecimiento significativa a la concentración de 100 mg L^{-1} (ANOVA $p < 0.01$). Al igual que en los anteriores experimentos, estas dos especies generaron mayor biomasa creciendo solas que en compañía de la otra especie. En el caso de *T. penicillata* y *N. carneum* hubo un mayor crecimiento en las primeras concentraciones disminuyendo significativamente según aumentaba el P en el medio (diferencias significativas, ANOVA $p < 0.01$). En la mayor concentración de fosfato apenas hubo crecimiento (biomasa igual al inóculo inicial). Finalmente, se vuelve a destacar cómo las especies fijadoras *T. penicillata* y *N. carneum* dominaron a bajas concentraciones del nutriente, mientras que, las especies no fijadoras *Phormidium* sp. y *L. boryana*, presentaron un crecimiento mayor a concentraciones superiores (diferencias significativas, ANOVA $p < 0.01$).

II.4. Discusión.

Los resultados obtenidos en el sustrato artificial mostraron diferencias en el crecimiento dependiendo de las cianobacterias y el medio empleado. En el medio de cultivo rico en nutrientes (AAN), que simulaba condiciones hipertróficas, dominaron las mismas especies que aparecían su vez en gran abundancia en el río en las mismas condiciones (*Phormidium* sp., *Synechococcus elongatus* y *Pseudanabaena catenata*). Por el contrario, *Tolypothrix penicillata*, *Nostoc carneum*, *Pleurocapsa minor* y, en menor medida *L. nostocorum*, mostraron una mayor abundancia en los puntos de muestreo con bajas concentraciones de nutrientes, presentando a su vez, un mayor crecimiento en el medio de cultivo que simulaba condiciones oligotróficas (CHU_{10D}). Por otra parte, otra especie como *L. boryana* y *Aphanocapsa muscicola*, no mostraron

diferencias claras en el crecimiento en ambos medios, aunque con una tendencia hacia un mayor crecimiento en el medio AAN, en relación también con los resultados obtenidos en campo. Así, los resultados de los experimentos en sustrato artificial parecen confirmar la distribución diferencial observada en relación con la calidad del agua del río Guadarrama.

En relación a los bioensayos realizados bajo un gradiente de nutrientes, los resultados han mostrado que las diferencias en el crecimiento de las especies estudiadas fueron significativas en la mayoría de los distintos regímenes de P y N, pudiendo ser éstos un factor selectivo en la dominancia de dichas especies. En los resultados de crecimiento de las especies por separado, se observó en primer lugar que, en el caso de las especies con heterocistos *Tolypothrix penicillata* y *Nostoc carneum*, a pesar de que en presencia de nitrato las diferencias no fueron muy marcadas, en el medio de cultivo la disminución en el crecimiento fue significativa cuando aumentaba la concentración de amonio. Al contrario, las especies *Phormidium* sp. y *Leptolyngbya boryana* presentaron un aumento en su crecimiento en ambos nutrientes, viéndose más favorecido en casi todas las concentraciones de amonio en comparación con el nitrato. Generalmente en cianobacterias, el orden de preferencia de la toma de los compuestos nitrogenados es el amonio, seguido del nitrato y urea (Wheeler y Kirchman, 1986; Shehawy y Kleiner, 2001). Varios estudios llegaron a la conclusión de que las especies de cianobacterias no fijadoras metabolizan bien ambos nutrientes, pero su fuente de nitrógeno preferida es el amonio siendo más competitivas bajo este nutriente (Blomqvist y col., 1994; Mitrovic y col., 2001). Por el contrario, Pfeiffer y Palinska (2002) y Choi y colaboradores (2003) encontraron al nitrato como fuente preferida de nitrógeno, en varias cepas marinas del género *Phormidium* y *Spirulina*, respectivamente.

La respuesta diferencial de distintas especies a distintas concentraciones de nutrientes, ha sido descrita en diversos ecosistemas acuáticos. Así, en experimentos llevados a cabo en condiciones limitantes de N, se han encontrado distintos comportamientos dependiendo de las cianobacterias estudiadas. Por ejemplo, *Synechococcus* PCC 6301 no creció en condiciones limitantes de N, sobre todo, de N-NH_4^+ (Ahlgren y Hyenstrand, 2003) y *Oscillatoria simplicissima*, aislada de un río sudafricano de características marcadas eutróficas, presentó una reducción en el largo de sus filamentos en respuesta a condiciones limitantes de N (Kruskopf y Du Plessis, 2006), indicando una inhibición en el crecimiento, como ya había sido descrito también

en *Anabaena affinis* en condiciones de estrés de nutrientes (Smith y Gilbert, 1995). En experimentos de competencia, *Phormidium tenue* fue más susceptible a la limitación de N que *Mycrocystis aeruginosa*, dominando en altas concentraciones de este nutriente (Fujimonto y Sudo, 1997). En estudios realizados en especies fitoplanctónicas en un río australiano, *M. aeruginosa* también se encontró dominante cuando disminuyeron los nutrientes, mientras que cuando aumentaban los nutrientes dominaban ciertas especies de clorofíceas (Mitrovic y col., 2001). Por otro lado, *Cylindrospermum stagnale* (especie con heterocistos) creció mejor a bajas concentraciones de nitrato que *Leptolyngbya foveolarum*, dominando en estas condiciones, y por el contrario, *L. foveolarum* dominó a altas concentraciones (Van der Griten y col., 2004).

En cuanto al fósforo, se le considera un nutriente esencial para el desarrollo de los organismos fotosintéticos, siendo además un nutriente limitante en las aguas fluviales. Cada especie requiere rangos de concentraciones diferentes de este nutriente para que su crecimiento sea óptimo (Schindler, 1977; Elser y col., 1990), siendo la disponibilidad de fósforo un factor importante en la determinación de la composición y abundancia de especies (Tilman y col., 1982). En estudios realizados por Sabater y colaboradores (2003) en tapetes de cianobacterias en ríos, se observó que especies filamentosas pertenecientes al género *Oscillatoria* fueron el componente dominante dentro de la comunidad estudiada (en una proporción que osciló entre el 40-90%), en aguas con concentraciones altas de fosfato (alrededor de 0.4 mg L^{-1}), junto con concentraciones de nitrato de 3.9 mg L^{-1} . Nuestros resultados mostraron en las especies estudiadas un comportamiento distinto con respecto al fósforo. *Tolypothrix penicillata* y *Nostoc carneum* tienen un crecimiento óptimo a concentraciones muy bajas de fosfato (0.2 mg L^{-1}), mientras que *Phormidium sp.* y *Leptolyngbya boryana*, por el contrario, crecen mejor en concentraciones más altas de fosfato, hasta un crecimiento máximo a 10 mg L^{-1} , valor a partir del cual, el crecimiento fue significativamente menor. En todas las especies estudiadas, la concentración máxima de 100 mg L^{-1} de fosfato supuso una inhibición del crecimiento.

Esta inhibición en el crecimiento a altas concentraciones de P ha sido descrita también en algunas cianobacterias. En un estudio llevado a cabo con dos cepas planctónicas de *Synechococcus*, ricas en ficoeritrina, se observó que no eran capaces de crecer en el medio de cultivo BG11 (con una concentración de 16.38 mg L^{-1} de fosfato), a no ser que esta concentración fuera reducida en un 30% (Ernst y col., 2005), a diferencia de otra cepa de *Synechococcus* rica en ficocianina, que presentó un

crecimiento significativo en esas concentraciones de P de dicho medio de cultivo. Estos resultados se relacionaron claramente con una mayor abundancia de una de estas cepas en la zona eufótica del lago Constanza donde el fosfato era mínimo (Gaedke y Weisse, 1998; Ernst y col., 2005).

Los valores óptimos de P dependen de cada especie, como se ha comentado también para el N. Pfeiffer y Palinska (2002) observaron que la concentración óptima para el crecimiento de seis cepas de *Phormidium*, aisladas de tapetes marinos, era de 20 mg L⁻¹ de fosfato. *Oscillatoria* sp., aislada de aguas residuales de una depuradora no creció por debajo de 3 mg L⁻¹ de fosfato (Marco y Orús, 1998). Además, se han encontrado diferencias entre cepas aisladas del mismo ambiente, explicadas por la posible existencia de “micronichos” o diferencias ecofisiológicas. Así, dos cepas de *Mycrocystis* que presentaron distintos morfotipos, uno colonial y otro unicelular, mostraron distinto comportamiento frente al P. La forma colonial creció bien a bajas concentraciones de P, mientras que la forma unicelular vio inhibido su crecimiento en condiciones limitantes de P (Shen y Shong, 2007). Además, cepas tóxicas de *Mycrocystis* presentaron mayor crecimiento a altas concentraciones de P que las cepas no tóxicas, aunque ambas parecían tener también, un elevado requerimiento de N (Vézie y col., 2002). En experimentos de competencia, al igual que en nuestros resultados respecto a las especies *Phormidium* sp. y *Leptolyngbya boryana*, también *Leptolyngbya foveolarum* creció mejor, y por tanto, dominó a altas concentraciones de P, con respecto a *Cylindrospermum stagnale* (Van der Grinten y col., 2004). *Planktothrix agardii* (antes *Oscillatoria agardii*) abundante en muchos lagos eutróficos de Holanda, tampoco fue competitiva en condiciones limitantes de P, siendo desplazada en experimentos de competencia, por la proclorofita *Prochlorothrix hollandica* (Ducobu y col., 1998).

Evidentemente, la concentración a la cual se observan estos fenómenos de inhibición en el crecimiento se ve modificada en los experimentos de competencia entre las especies. En nuestros resultados, el crecimiento observado en competencia es similar al de los casos individuales, salvo que se ha desplazado tanto la concentración de crecimiento máximo como de comienzo de los efectos de inhibición. Este fenómeno se debe a que la disponibilidad de fósforo es menor (los casos mezcla contienen el doble de biomasa que los individuales). En relación con esto último, Van der Grinten y colaboradores (2004) llegaron a la conclusión de que en monocultivos con una sola especie el crecimiento es mayor que en aquellos donde coexiste con una mezcla de

varias especies u organismos de características similares. Es de esperar ya que al compartir la misma cantidad de nutriente, disminuya el crecimiento de las especies.

Se han sugerido distintos mecanismos de adaptación de las especies dominantes en medios oligotróficos. Por una parte, el mucílago (presente en ambos aislados) puede ayudar a sobrevivir a dichos organismos en medios pobres en nutrientes, ya que puede tener un papel importante en la captación y asimilación de nutrientes (Reynolds, 2007). Además, la capacidad de llevar a cabo una actividad fosfatasa cuando las concentraciones de P son bajas junto con una distinta utilización de las reservas de P, han sido descritas como estrategias fundamentales en organismos característicos de aguas oligotróficas (Whitton y col., 2005; Mateo y col., 2006; Ou y col., 2005; Shen y Song, 2007). Por lo tanto, en el medio donde el aporte de fósforo es variable e intermitente, las cianobacterias son capaces de reaccionar a los cambios en la carga de nutrientes regulando los mecanismos de absorción y utilización de P para un crecimiento óptimo.

En resumen, se puede afirmar que las distintas concentraciones de los nutrientes de N y P en el medio producen cambios en la estructura y composición de las comunidades, afectando así en la competencia de las especies tal y como ha sido sugerido previamente (Sommer, 1996; Fujimoto y Sudo, 1997). Se han realizado numerosos trabajos en comunidades fitoplanctónicas, y apenas se han registrado en comunidades de cianobacterias bentónicas en ríos. Las cianobacterias son consideradas como organismos muy heterogéneos cuyas diferencias en la adaptación y ecología podrían tratarse de manera individual más que como un grupo (Blomqvist y col., 1994). En este sentido, los resultados obtenidos aportan mayor información sobre los patrones de crecimiento de ciertas especies de cianobacterias bentónicas, y a la vez, apoyan la importancia de entender la dominancia de cada una de ellas según sus diferencias en la habilidad de la toma de nutrientes como en sus preferencias ecológicas, que a su vez, podrá proporcionar mayor información sobre el estado trófico en que se encuentran. Nuestros resultados han demostrado distintas respuestas de las especies seleccionadas a distintas condiciones de nutrientes. Estos resultados confirman y explican el hecho de que las especies fijadoras de nitrógeno *T. penicillata* y *N. carneum* dominaron en los puntos de muestreo con bajas concentraciones de nutrientes, mientras que las especies *Phormidium* sp. y *L. boryana* dominaron bajo condiciones eutróficas-hipertróficas, aunque en menor medida, la última citada.

III. Análisis de la diversidad de cianobacterias mediante TGGE

III. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE CIANOBACTERIAS MEDIANTE TGGE.

III.1. Introducción.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo consiste en la caracterización genética de la diversidad de las comunidades de cianobacterias localizadas en distintos puntos de muestreo del río Guadarrama, bajo un gradiente de eutrofización aguas abajo. Con el objetivo de comparar y analizar las posibles diferencias entre las comunidades a nivel estacional, se aplicó la técnica molecular TGGE.

Los resultados obtenidos en el capítulo 1 junto con estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación (Perona y col., 1998; Douterelo y col., 2004; Perona y Mateo, 2006) indicaban cambios tanto en la estructura como en la composición de las comunidades de cianobacterias en respuesta a un gradiente de eutrofización. Como consecuencia, la diversidad de cianobacterias disminuyó aguas abajo, aumentando la abundancia de algunas, proliferando las especies más tolerantes o mejor adaptadas (Douterelo y col., 2004) a altas concentraciones de nutrientes. Estos estudios realizados tanto de composición y estructura de comunidades de cianobacterias como de diversidad, están basados principalmente en técnicas tradicionales que consisten en una identificación taxonómica muy precisa de los individuos. Dichas técnicas conllevan un largo tiempo en el procesamiento de las muestras como los problemas derivados de la taxonomía de cianobacterias. En consecuencia, se hace necesario el desarrollo y posible aplicación de nuevas técnicas que optimicen la metodología y el tiempo empleado en la obtención de resultados. Las técnicas moleculares han sido aplicadas en la actualidad en la detección y caracterización de microorganismos en el medio ambiente (Cho y Tiedje, 2002; Malik y col., 2008; Bates y col., 2010), siendo las técnicas de “fingerprinting” o huella molecular TGGE/DGGE, también muy utilizadas en el análisis de la diversidad en comunidades bacterianas en distintos ambientes (Fromin y col., 2002; Casamayor y col., 2002; Brinkmann y col., 2007) como también en estudios de dinámica de poblaciones a nivel espacio-temporal (Muyzer y Smalla, 1998; Beier y col., 2008).

En nuestro estudio, la técnica TGGE nos permitió generar un perfil genético representativo de la comunidad de cianobacterias en los distintos puntos de muestreo, con la finalidad de obtener una huella genética característica de los mismos, con el objetivo final de su posible aplicación en un futuro en la biomonitorización de la calidad del agua en ríos.

III.2. Análisis de los perfiles de TGGE de la región ARNr 16S.

Con el fin de observar las diferencias en la estructura y composición de las comunidades de cianobacterias entre los distintos puntos de muestreo, se generaron perfiles genéticos mediante la amplificación por PCR de los genes ARNr 16S (450 pb) presentes en el ADN del epilíton raspado, seguido de la separación específica de secuencias por medio de TGGE. Para este trabajo se han realizado 50 geles de TGGE, con resultados similares para cada punto de muestreo y estación muestreada (resultados no mostrados) de los cuales se muestran los 8 geles de TGGE representativos de los distintos puntos de muestreo, correspondientes a las distintas estaciones climatológicas y a la aplicación de dos juegos de cebadores (CYA781Ra y CYA781Rb) (Fig. 45). Se utilizó un marcador de referencia con cultivos de cianobacterias aislados previamente con el fin de comparar los geles entre sí, y facilitar la identificación de bandas comunes. En los geles se representa cada punto de muestreo (GU1, GU2 y GU3) con tres réplicas en cada uno (A, B y C) que se corresponden con las tres piedras recogidas en cada punto de muestreo. El número de bandas encontrado está indicado en la parte inferior de las fotos de los geles de TGGE en cada réplica. La riqueza de bandas observada fue similar entre las réplicas (piedras distintas) en cada punto de muestreo. Además, se encontraron diferencias en los puntos de muestreo encontrándose mayor número de bandas aguas arriba (punto GU1) en todas las estaciones climatológicas (Fig. 44), como también diferencias a nivel estacional.

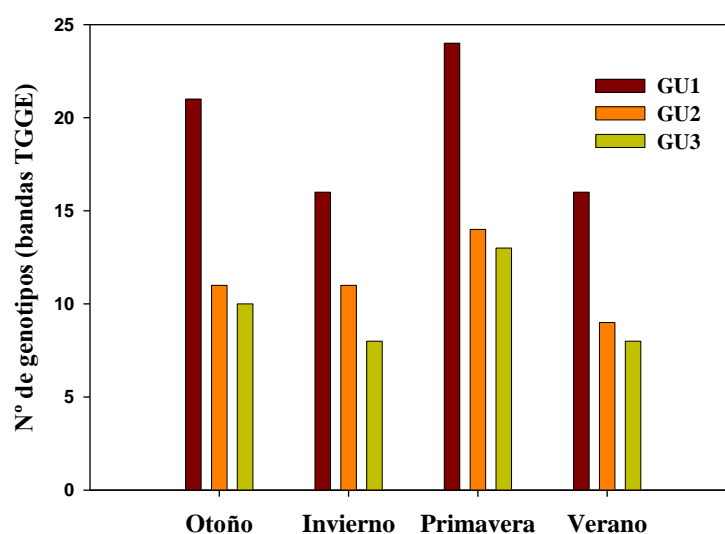
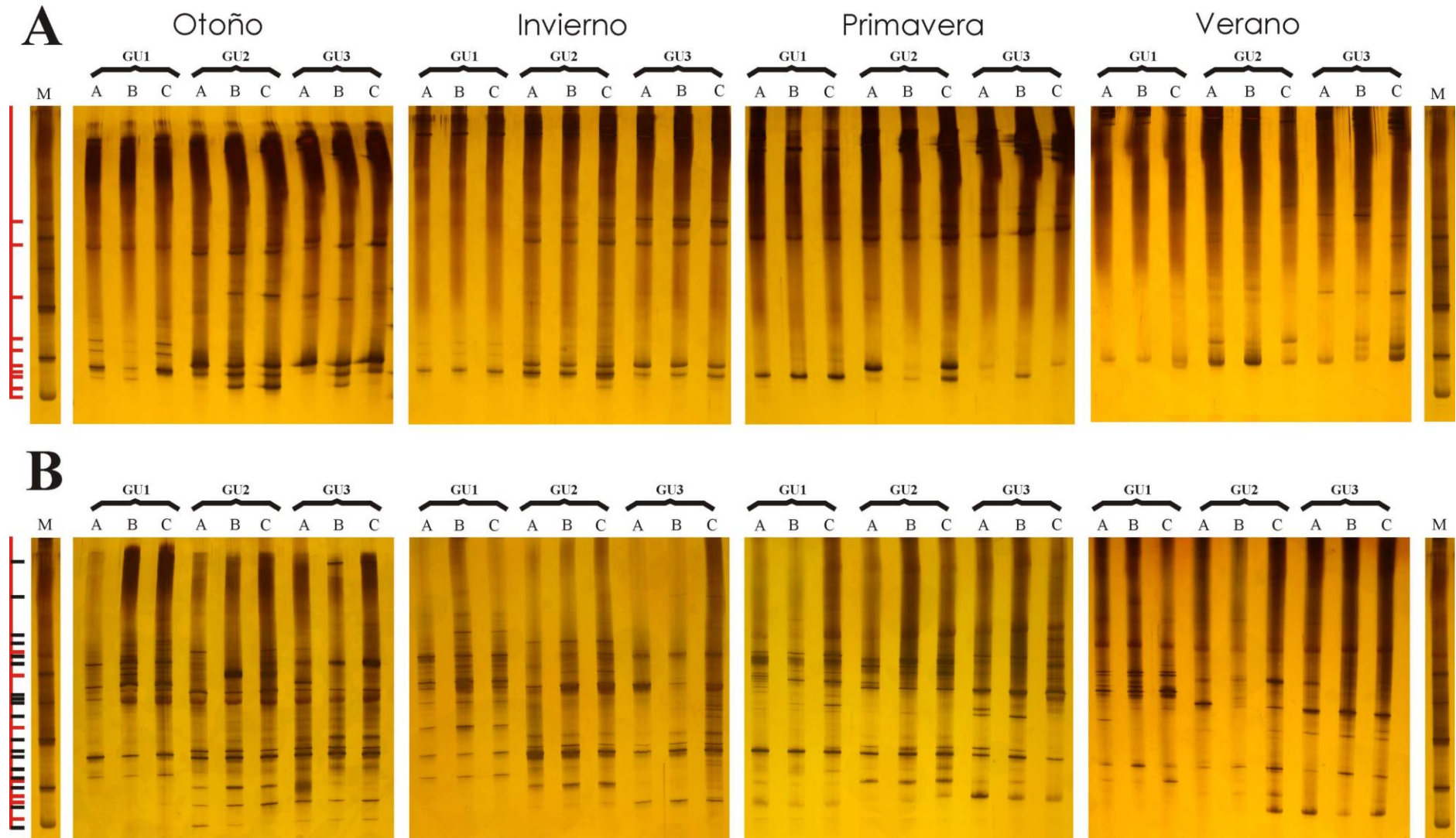


Figura 44. Riqueza de bandas (número de genotipos) encontrados en los puntos de muestreo en cada una de las estaciones climatológicas estudiadas.

Figura 45. Análisis comparativo de los perfiles genéticos de TGGE de las muestras del epilíton del río Guadarrama. En los geles se representan los tres puntos de muestreo (GU1, GU2 y GU3) con tres réplicas (piedras A, B y C) en las distintas estaciones climatológicas. (A). Perfiles de TGGE obtenidos con el par de cebadores CYA359–CYA781A, el cual amplifica principalmente cianobacterias heterocistas y algunos géneros del orden Oscillatoriales; (B) utilizando los cebadores CYA359–CYA781B, los cuales amplifican mayoritariamente Chroococcales y Oscillatoriales. M= marcador. Las líneas situadas a la izquierda de la imagen marcan las distintas alturas o posiciones estandarizadas de las bandas encontradas.



III.3. Análisis digital y estadístico de las bandas.

Una vez realizados los geles de TGGE en cada estación climatológica y aplicando dos juegos de cebadores, se llevó a cabo un tratamiento digital de cada uno de ellos. En primer lugar se estandarizaron en todos los geles las distintas posiciones de las bandas empleando el marcador de referencia con los cultivos aislados previamente, y su abundancia mediante la intensidad de cada una de las bandas. El análisis de los geles mostró un total de 490 bandas presentadas en 53 posiciones diferentes. Se recortaron un total de 400 bandas, de las cuales se amplificaron con éxito 200, que posteriormente fueron secuenciadas.

Existen numerosos factores o componentes a estudiar dentro de este apartado (perfiles de bandas, riqueza de genotipos, diversidad, efecto de los nutrientes), y por ello se utilizaron una serie de parámetros y herramientas estadísticas para poder estimar la distribución de los datos obtenidos de los perfiles de TGGE. En primer lugar, se llevaron a cabo análisis de agrupamientos jerárquicos con las posiciones o alturas de las bandas encontradas en los distintos perfiles genéticos de los geles de TGGE. Las similitudes medias entre los perfiles genéticos de los tres puntos de muestreo fueron presentadas en dendogramas (Fig. 46), con el fin de evaluar diferencias entre perfiles genéticos. Como resultado, se obtuvo un dendograma donde aparecieron los tres puntos de muestreo agrupados en una serie de grupos. En primer lugar se reflejaron dos grupos principales y, por tanto, con perfiles de bandas distintos. El primer grupo lo formaron las distintas muestras del punto GU1 (oligo-mesotrófico) y dentro del mismo, se encontraron subgrupos que marcaron diferencias significativas estacionales (línea discontinua), separando la estación estival del resto (Fig. 46, subgrupo Ia). El segundo grupo principal está constituido por el bandeo correspondiente a los puntos de muestreo GU2 y GU3 (eutróficos-hipertróficos). Dentro del mismo, se formaron a la vez una serie de subgrupos que indicaron diferencias significativas estacionales en ambos puntos de muestreo (IIa, IIb, IIc y IId). En concreto, se agruparon los perfiles genéticos de otoño de ambos puntos de muestreo en el mismo subgrupo (IIb), pero a su vez, separados por subgrupo significativos. En relación al punto GU2, existieron diferencias significativas entre las estaciones de invierno y primavera en la mayoría de las réplicas (subgrupo IIc), mientras que los perfiles de verano formaron un grupo aislado junto con los del punto GU3 (subgrupo IId). En cuanto a este último punto de muestreo, mostró también diferencias a nivel estacional con grupos significativos en todas las estaciones climatológicas.

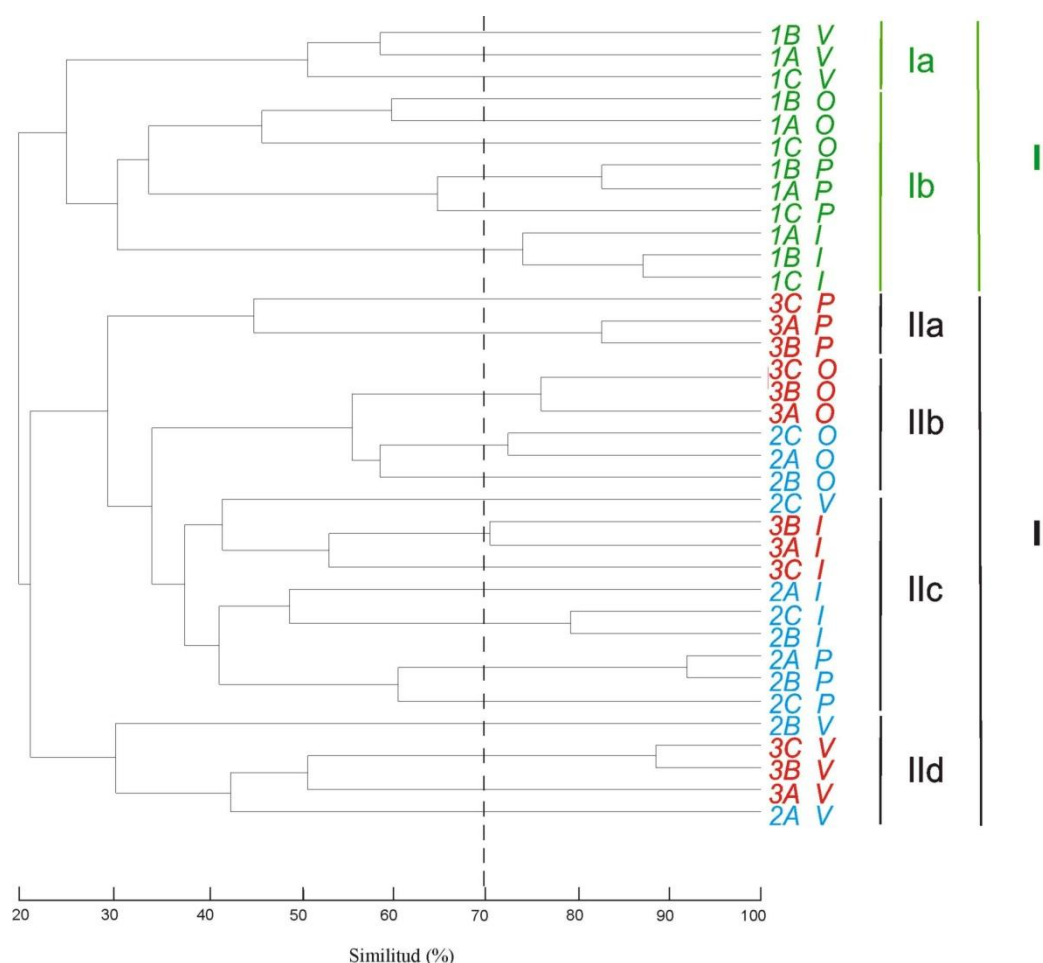


Figura 46. Dendrograma (UPGMA) obtenido del análisis de agrupamientos jerárquicos empleando el índice de Jaccard realizado con las posiciones de bandas de los distintos puntos de muestreo y las estaciones climatológicas muestreadas (O, I, P y V) derivadas de los perfiles genéticos, presentados en la figura 45. La línea discontinua representa el valor de corte para grupos significativos.

Con el fin de comprobar la influencia del gradiente de eutrofización aguas abajo sobre la diversidad de las comunidades de cianobacterias, se calculó el índice de Shannon-Weaver como medida de la diversidad empleando los distintos perfiles genéticos de cada punto de muestreo (Tabla 14). Para ello se utilizaron los datos tanto de riqueza de bandas (número de bandas en cada punto de muestreo, Fig. 44) como la intensidad de las mismas. Los resultados mostraron una disminución de la diversidad en las comunidades de cianobacterias aguas abajo, en la cual se encontraron diferencias significativas (ANOVA; $p < 0.05$) entre los puntos GU1 con GU2 y GU3 en todas las estaciones menos en otoño, donde no se observaron diferencias entre GU1 y GU2. Comparando los valores de diversidad entre los puntos GU2 y GU3, no se encontraron diferencias significativas entre ambos. A nivel estacional también se observaron cambios en la diversidad, aunque sólo se encontraron diferencias significativas con respecto a la estación de verano, el resto no presentan diferencias significativas.

Tabla 14. Valores del Índice de diversidad de Shannon-Weaver calculado a partir de los distintos perfiles de bandas de los geles de TGGE en cada estación climatológica. Se representan los valores medios y desviaciones estándar.

Índice de Shannon-Weaver				
Punto de muestreo	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
GU1	3.31±0.30	3.50±0.13	3.47±0.16	3.10±0.09
GU2	3.14±0.06	2.88±0.30	3.08±0.10	2.41±0.07
GU3	2.89±0.13	2.79±0.12	3.07±0.03	2.40±0.23

Finalmente, se realizaron una serie de regresiones no lineales con el fin de estimar la relación entre el número de bandas y las concentraciones de nutrientes encontradas en los distintos puntos de muestreo (Fig.47).

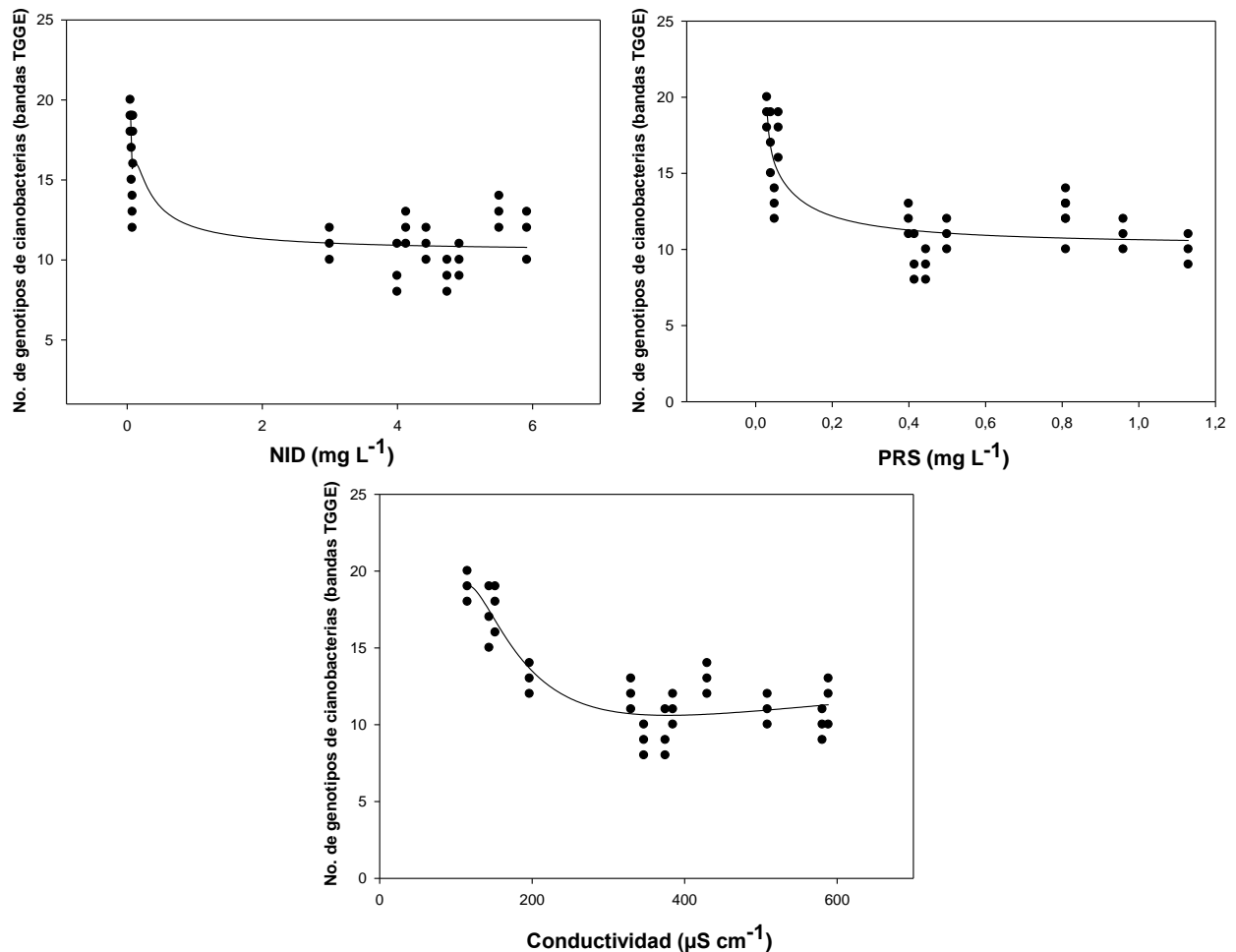


Figura 47. Análisis de regresiones no lineales entre el número de genotipos (número de bandas de TGGE) encontrados en los perfiles genéticos y las concentraciones de NID, PRS y conductividad encontradas en el río Guadarrama.

Según las gráficas obtenidas, se observó una disminución en el número de genotipos (bandas de TGGE) según aumentaban tanto la concentración de nutrientes (NID y PRS) como la conductividad. El modelo de regresión que mejor adaptó nuestros datos se correspondió con regresiones no lineales (ecuaciones polinomiales inversas de tercer grado) las cuales mostraron valores del coeficiente de correlación (r) correspondientes a 0.84, 0.90 y 0.89 respectivamente. Por lo tanto, el incremento en los nutrientes, que tiene una incidencia clara en el incremento de la conductividad, parece tener un efecto negativo en el número de genotipos aguas abajo. En el apartado III.5 de este capítulo, se mostrará el posible efecto de todas las variables ambientales en su conjunto en la distribución de las bandas, agrupadas en las posiciones marcadas (Fig. 45).

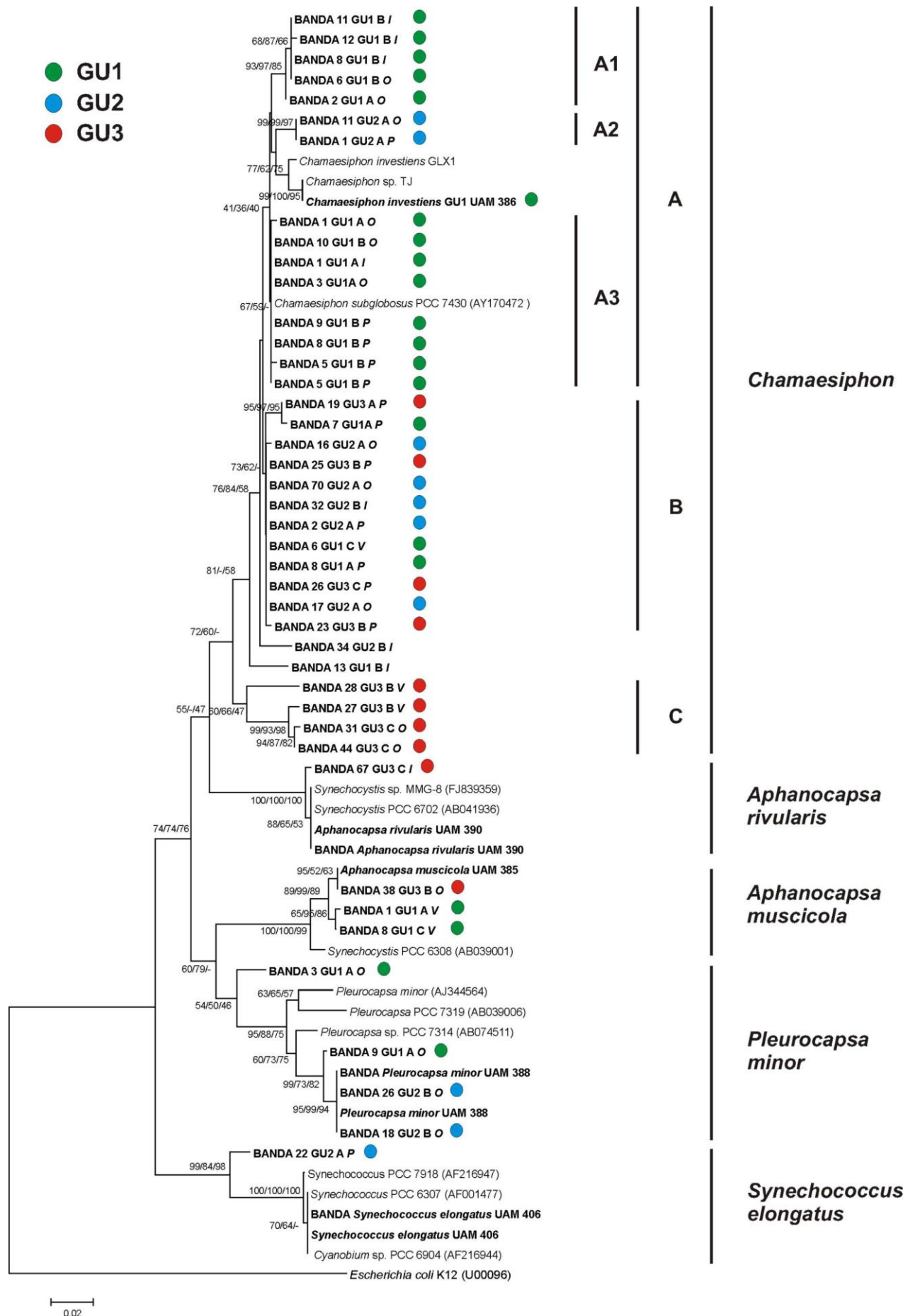
III.4. Análisis filogenéticos de las secuencias obtenidas.

Una vez visualizados los distintos patrones de bandas encontrados en los gels de TGGE, se secuenciaron un total de 200 bandas, de las cuales 112 fueron utilizadas para el análisis filogenético. El resto de las bandas que no se pudieron utilizar fue debido a la formación de heteroduplex o errores en la secuenciación debido a la poca concentración del amplicón necesaria.

Para el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S (450 pb) correspondientes a las bandas de TGGE, se construyeron distintos árboles filogenéticos según los órdenes de clasificación taxonómica de las cianobacterias. Las secuencias obtenidas de las bandas se compararon con las de las bases de datos (GenBank), y aquellas secuencias que presentaron similitud con las bandas, fueron empleadas para la construcción de los árboles. Así, se construyeron dos árboles filogenéticos correspondientes al orden Chroococcales (Fig. 48) y otro relativo al orden Oscillatoriales (Fig. 49) incluyendo secuencias procedentes de las bases de datos (GenBank).

Figura 48. Árbol filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S (1200 pb) de las bandas de TGGE pertenecientes al Orden Chroococcales, procedentes de los perfiles obtenidos de las muestras de campo recogidas del río Guadarrama. Este árbol se construyó a partir de los análisis de neighbour-joining (NJ), maximum-likelihood (ML) y maximum-parsimony (MP). Se muestran los valores de bootstrap mayores de 50%. Las secuencias determinadas en este estudio aparecen en negrita. El n° de acceso de las secuencias empleadas para la construcción de este árbol filogenético se indica después del nombre del taxón →

III. Biodiversidad de cianobacterias mediante TGGE



Ambos árboles se realizaron mediante los métodos de neighbor-joining (NJ), maximum likelihood (ML) y maximum parsimony (MP), produciéndose una topología de los árboles muy similar, y por tanto, sólo se representaron los correspondientes al método NJ.

En el árbol filogenético correspondiente al orden Chroococcales (Fig. 48) se observaron cinco grupos principales asociados a distintos géneros y especies de cianobacterias, compuesto a su vez, por 45 bandas de TGGE. El grupo principal se corresponde con el género *Chamaesiphon* sustentado a su vez por valores de bootstrap altos. Dentro de este cluster se encontraron distintos subgrupos pertenecientes a distintos genotipos de *Chamaesiphon*.

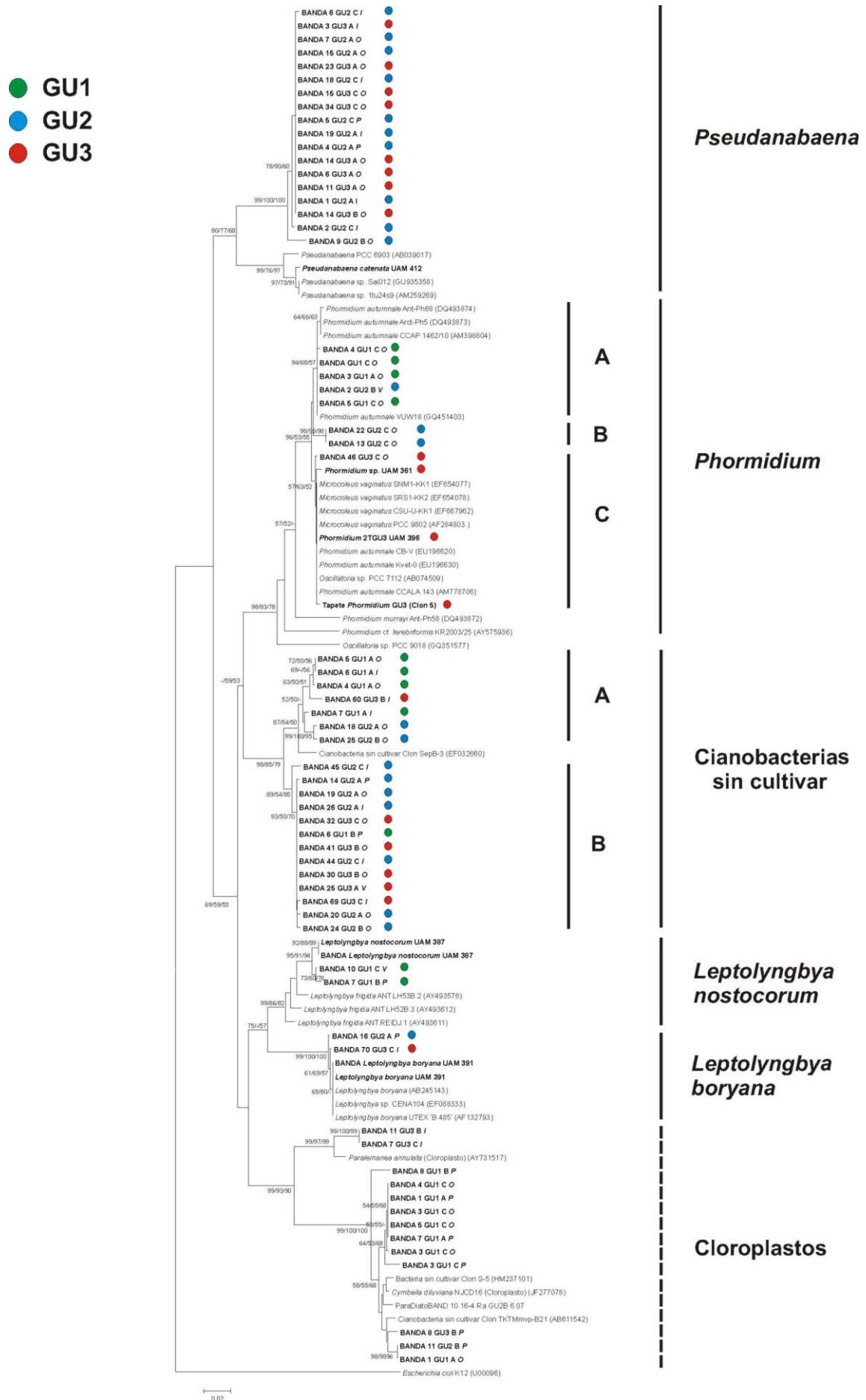
El grupo **A** lo constituyó un elevado número de bandas procedentes en su mayoría del punto de muestreo GU1 (señalado en color verde en el árbol). Dentro de este grupo, se pudieron distinguir tres genotipos distintos (**A1, A2 y A3**). El genotipo A1 lo componen un conjunto de bandas con un gran soporte (93/97/85 para los análisis de NJ, ML y MP, respectivamente), cuyas identidades situaron dentro del 99.8 y el 100 % de similitud. Cercano a este subgrupo, se ubicó el genotipo A2 soportado por valores de bootstrap muy elevados (99/99/97), compuesto por dos bandas localizadas en el punto GU2 (color azul). Ambos genotipos también se agruparon con cultivos aislados procedentes de puntos oligo-mesotróficos aguas arriba de los ríos Guadarrama y Guadalix (GU1 y GLX1) identificado como *Chamaesiphon investiens*. Los valores de similitud entre las secuencias de los cultivos aislados con el genotipo A1 fueron del 96.7%, y con el A2 97.4%. Por último, el genotipo A3 está compuesto por un mayor número de bandas, todas procedentes del punto GU1 y con valores de similitud entre ellas del 98.4%. Comparando sus secuencias con los cultivos aislados citados anteriormente, se encontraron identidades del 97.4% de similitud. Los valores de similitud encontrados comparando los tres genotipos fueron los siguientes: A1 y A2 97.7%, A1 y A3 entre 98.1-98.7% y por último, A2 y A3, 97.7%. Muy próximo a este grupo se situó el subgrupo **B** con valores de bootstrap altos compuesto mayoritariamente por bandas procedentes de los puntos GU2 y GU3. La similitud de las secuencias que componen este subgrupo se situó dentro del rango del 98.8 y el 99.5% de similitud. El subgrupo **C** lo componen bandas procedentes del punto de muestreo GU3 (color rojo) con una similitud entre ellas del 99.3 y 99%, y con la banda más separada (BANDA 28 GU3 B V) una similitud menor del 95.2%. Los valores de similitud observados entre el subgrupo B y C fueron del 94%, y entre el subgrupo C y

los genotipos del A los valores fueron menores del 94.3%. Finalmente, las identidades entre el subgrupo B y los genotipos del A, oscilaron entre el 96.7-97.9% de similitud.

El segundo grupo comprende las cianobacterias pertenecientes al aislado *Aphanocapsa rivularis* UAM 390 junto con la banda de TGGE procedente del punto de muestreo GU3, agrupadas con un soporte muy elevado (100/100/100). La similitudes dentro del grupo oscilan entre el 99.5 y 100%. Otro grupo cercano a este último es el correspondiente a otra especie del mismo género, *Aphanocapsa muscicola*. Lo constituyeron secuencias propias de las bandas de TGGE del cultivo aislado identificado como *A. muscicola* UAM 385 y bandas procedentes de los puntos de muestreo GU3 y GU1, de este último en mayor proporción. Los porcentajes de similitud entre ellas oscilaron entre 99.1-100%, y con la secuencia del GenBank se obtuvo una similitud del 98.1%. Las identidades de ambos grupos fueron menores del 90% de similitud. El cuarto grupo lo representaron las secuencias pertenecientes a la especie *Pleurocapsa minor* junto secuencias de las bases de datos. En él se agruparon el cultivo aislado *Pleurocapsa minor* UAM 388, y su banda correspondiente junto con las bandas procedentes de los puntos GU1 y GU2. Los valores de similitud entre las secuencias oscilaron entre 95.8% con la banda 3 GU1 A O y entre el 98.8 y 100% con el resto de ellas. El último grupo lo conforman las secuencias identificadas como *Synechococcus elongatus* agrupadas con un soporte de bootstrap elevado (99/84/98) procedentes tanto del GenBank como del cultivo aislado *Synechococcus elongatus* UAM 406. Los valores de identidad encontradas entre ellas fueron de 95.8 hasta el 96% de similitud. La banda correspondiente de TGGE procedió del punto de muestreo GU2.

El segundo árbol filogenético construido se corresponde con aquellas bandas de TGGE pertenecientes principalmente al orden Oscillatoriales (Fig. 49). En él se observaron seis grupos asociados mayoritariamente a distintos géneros y especies de cianobacterias, compuesto por un total de 66 bandas. El primer grupo pertenece al género *Pseudanabaena* apoyado por un buen soporte de bootstrap (80/77/68). Está constituido por un gran número de bandas junto con secuencias del GenBank y el cultivo aislado identificado como *Pseudanabaena catenata* UAM 412.

Figura 49. Árbol filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S (1200 pb) de las bandas de TGGE pertenecientes al Orden Oscillatoriales, procedentes de los perfiles obtenidos de las muestras de campo recogidas del río Guadarrama. Este árbol se construyó a partir de los análisis de neighbour-joining (NJ), maximum-likelihood (ML) y maximum-parsimony (MP). Se muestran los valores de bootstrap mayores de 50%. Las secuencias determinadas en este estudio aparecen en negrita. El n° de acceso de las secuencias empleadas para la construcción de este árbol filogenético se indica después del nombre del taxón →



Todas las bandas extraídas fueron encontradas en los puntos GU2 y GU3. El conjunto de bandas mostraron entre ellas valores de similitud del 99.5%, y con respecto al cultivo y las secuencias del GenBank, obtuvieron unas similitudes cercanas, pero por debajo del 95%, que podrían indicar que se tratan de géneros distintos.

El segundo grupo lo constituyeron las bandas pertenecientes al género *Phormidium*, dentro del cual, se pudieron distinguir tres genotipos (A, B y C). Respecto al genotipo **A**, se agruparon las bandas procedentes mayoritariamente del punto GU1 con un soporte elevado (94/68/57). Las identidades de este grupo de secuencias se correspondieron con valores entre 99.3-99.8% de similitud, junto con secuencias de las bases de datos del género *Phormidium* procedentes principalmente de zonas polares. El genotipo **B**, situado muy cercano al anterior, lo formaron dos bandas encontradas en el punto GU2 agrupadas con un valor de bootstrap elevado (98/95/98). La similitud entre ambas secuencias fue del 100%, mientras los valores entre este subgrupo y el anterior fueron del 98%. El genotipo **C** lo formó una banda localizada en el punto GU3 junto con una de las secuencias encontrada en un tapete de *Phormidium* de dicho punto y cultivos aislados procedentes también del GU3, con otras extraídas del GenBank pertenecientes a los géneros *Phormidium*, *Microcoleus* y *Oscillatoria* (soporte: 57/63/52). Las similitudes encontradas en este subgrupo se correspondieron con valores entre 99.3-100%. Comparando las similitudes de los tres genotipos (A, B y C), mostraron valores entre 98-98.4%. En el capítulo siguiente se estudiará en detalle las cianobacterias pertenecientes al género *Phormidium* desde un punto de vista morfológico, genético y ecológico.

Dentro del árbol se encontraron también dos grupos con un elevado soporte pertenecientes al género *Leptolyngbya*. El primero estaba formado por bandas procedentes del punto GU1, junto con secuencias de las bases de datos y por el cultivo aislado identificado como *Leptolyngbya nostocorum* UAM 387. Las identidades entre las bandas con el cultivo fue del 99.3%, mientras que con el resto de las secuencias se correspondieron con valores del 97.6%. Por otro lado, el grupo identificado como *Leptolyngbya boryana* lo constituyeron bandas procedentes de los puntos GU2 y GU3 y secuencias de las bases de datos con valores de similitud entre el 99.5-100%. En él también se situaron las secuencias y la banda correspondiente al aislado *Leptolyngbya boryana* UAM 391 con elevados porcentajes de similitud.

Otro grupo formado por un gran número de bandas se correspondió con secuencias de cianobacterias sin cultivar según las bases de datos, cuyos porcentajes de

similitud fueron del 96- 98%. Igualmente, se formaron dos subgrupos (A y B) con similitudes entre ellos del 96.4%, mientras que entre las secuencias del mismo subgrupo las identidades fueron del 99.8% de similitud. Las bandas del subgrupo A se localizaron en su mayoría en el punto GU1, mientras que en el subgrupo B se observaron principalmente en los puntos GU2 y GU3. En relación al último grupo, las bandas encontradas se agruparon con un alto soporte (99/93/90) con secuencias asociadas principalmente a cloroplastos de rodofitas (*Paralemanea annulata*) y diatomeas (*Cymbella diluviana*), por lo que se piensa que se pueden corresponder con cloroplastos de dichas algas, observadas en el río.

III.5. Distribución de los genotipos con respecto a las variables ambientales.

Una vez realizados los distintos análisis tanto de perfiles genéticos, diversidad de genotipos, regresiones con los nutrientes procedentes de los puntos de muestreo encontrados en el río Guadarrama y filogenia, se realizó un análisis final de datos de las comunidades de cianobacterias y su relación con los factores ambientales. Para ello, se aplicaron dos tipos de análisis de ordenación. Por un lado, se utilizó un análisis de correspondencia (CA) para ver cómo se distribuyen las especies dentro de los puntos de muestreo, y un análisis de correspondencias canónicas (CCA) para ver cómo afectan de los factores ambientales en la distribución de las especies. Los datos analizados se corresponden con las bandas (genotipos de cianobacterias) de los geles de TGGE en los diferentes puntos de muestreo, ordenados en una matriz compuesta por los valores de abundancia relativa (intensidad de las bandas) de cada banda, y de presencia/ausencia de las mismas. Por otro lado, se generó otra matriz con los datos de los factores ambientales medidos en campo en cada punto de muestreo y estación climatológica correspondientes a: oxígeno disuelto, nitrógeno inorgánico disuelto (NID), fósforo reactivo soluble (SRP), caudal, temperatura y conductividad.

Los resultados correspondientes al análisis de correspondencias (CA) se muestran en la figura 50. Los valores de los ejes explicaron el 38.3% de la varianza (el eje 1 explica un 20% y el eje 2 un 18.3%). Para discernir entre tantos puntos, se representaron los gráficos con los puntos de muestreo por separado (Fig. 50, A), y después agregando las posiciones de las bandas (Fig. 50, B). Como se muestra en la figura 50, los puntos de muestreo se separaron claramente, encontrándose el punto GU1 en el cuadrante superior derecho, mientras que los puntos GU2 y GU3 se situaron en los

cuadrantes inferiores. Las bandas se distribuyeron en pequeñas agrupaciones según los distintos puntos de muestreo.

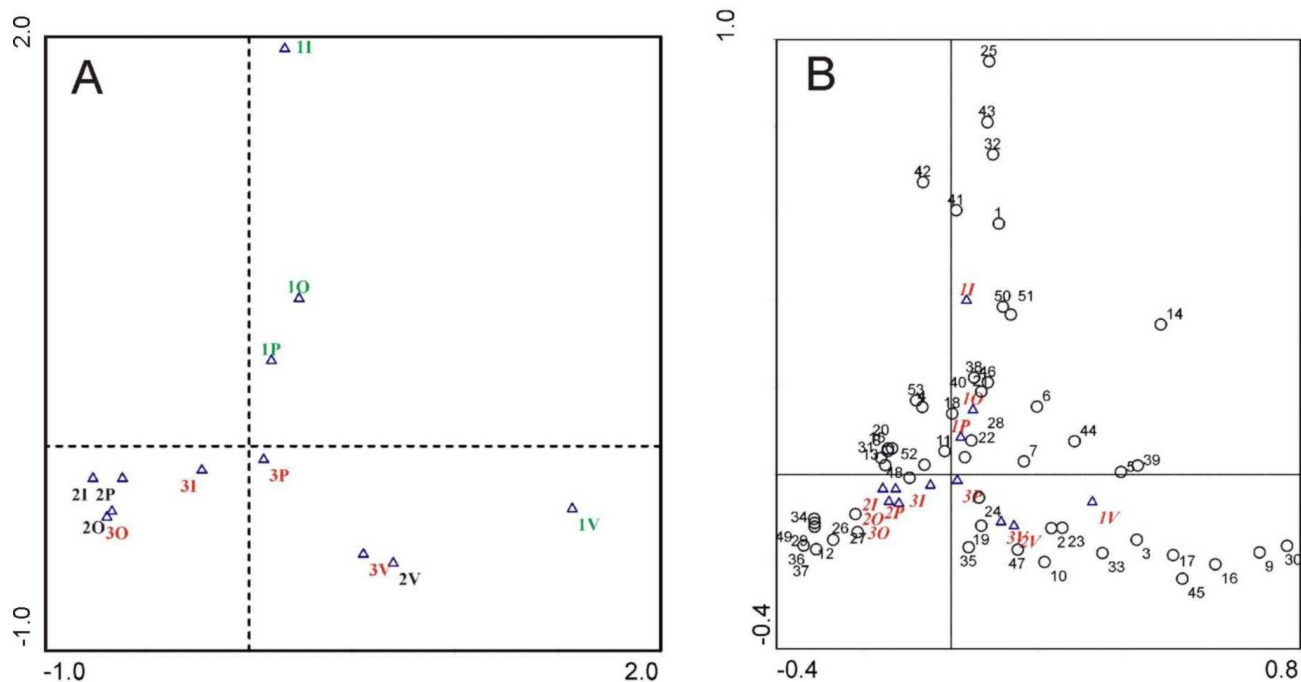


Figura 50. Análisis de correspondencia (AC) correspondientes a las posiciones de las bandas derivadas de los perfiles genéticos. Se muestra por separado la distribución tanto de los puntos de muestreo (A) y a la vez, con las distintas posiciones de las bandas.

A continuación, se realizó un análisis de correspondencias canónicas (CCA) incluyendo las variables ambientales (Fig. 51). Los resultados de la ordenación canónica mostraron una distribución similar al obtenido por el CA, donde el porcentaje de la varianza explicada de la estructura de la comunidad (bandas) por los tres ejes fue del 48.6 % (eje 1: 22.2%, eje 2: 14.6%, y eje 3:) y el porcentaje de la varianza acumulada por la relación entre las especies (bandas) y las variables ambientales alcanza el 73.6% (eje 1:, eje2 : y eje 3:). Este porcentaje nos indica en nivel de predicción que se obtiene para explicar la dinámica de la estructura de las comunidades de cianobacterias a partir del conjunto de parámetros físico-químicos incluidos en este análisis. El test estadístico de Monte Carlo indicó que los factores abióticos se correlacionaron significativamente con el primer eje ($p < 0.01$), y también, el test de significación de todos los ejes canónicos fueron igualmente significativos ($p < 0.01$). El primer eje está principalmente definido por la temperatura, caudal y oxígeno disuelto (peso de las variables: 0.42, -0.75, y -0.54, respectivamente), el segundo eje está correlacionado mayoritariamente por el oxígeno disuelto, temperatura y NID (peso: 0.67, -0.34 y 0.33) y, por último, el

tercer eje está definido por la conductividad, PRS y NID (0.86, 0.76 y 0.75). El análisis permitió en primer lugar, delimitar los puntos de muestreo según sus parámetros físico-químicos de tal manera que los puntos GU2 y GU3, se localizaron en los cuadrantes inferiores del gráfico, definidos por una gran carga de nutrientes, caudal y temperatura.

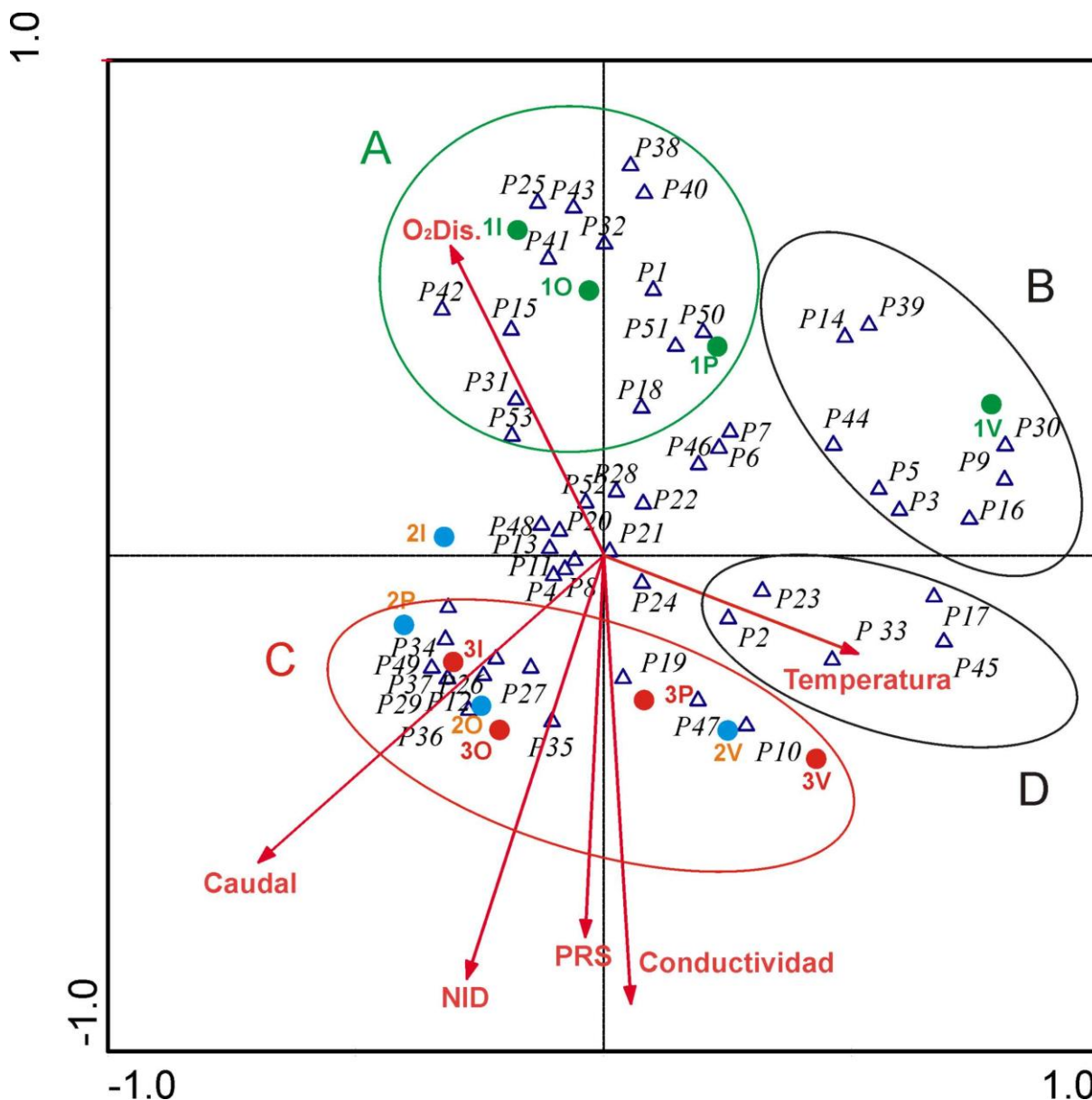


Figura 51. Análisis de correspondencias canónicas (CCA) basado en las posiciones de las bandas derivadas de los perfiles genéticos de los geles de TGGE presentados en la figura 45, juntos con los datos de las variables ambientales. NID: Nitrógeno Inorgánico Disuelto; PRS: Fósforo Reactivo Soluble; O₂ Dis: Oxígeno Disuelto.

De forma contraria, el punto 1 quedó localizado en el sentido contrario (cuadrantes superiores) definidos principalmente por el oxígeno disuelto. Así mismo, se observó la separación de grupos de bandas (genotipos) según los puntos de muestreo y las variables ambientales.

Así, se observó la presencia de algunos grupos de bandas ubicadas en gran medida en el punto GU1 (grupo A) de características oligotróficas pertenecientes en su mayoría a las posiciones P1, P15, P18, P25, P40, P41 y P42, que según las secuencias de las bandas que las componen, se corresponden con los genotipos A1 y A3 del género *Chamaesiphon* según el análisis filogenético (Fig. 48). Junto a estas posiciones, se localizaron dos más (P50 y P51) cuyas bandas pertenecieron al género *Phormidium*, en concreto al genotipo A (Fig. 49). También se encontraron en las posiciones o alturas P53 y P32 secuencias asociadas a cloroplasto de diatomeas y también posiciones cuyas bandas que no tuvieron éxito en la reamplificación (P43 y P38).

De igual manera, se observó un grupo de bandas situado a la derecha (grupo B), y cercano al punto GU1 V (en verano), relacionado posiblemente con un menor caudal ya que se encuentra situado en el lado opuesto de esta variable abiótica. Lo formaron las posiciones cuyas bandas fueron identificadas también dentro del género *Chamaesiphon* (P16 y P3) pero correspondientes al genotipo A2, A3 y B. Además, se encontraron secuencias identificadas como *Leptolyngbya nostocorum* (posición P30) según el análisis filogenético estudiado anteriormente. Existen un conjunto de ellas correspondientes tanto a cianobacterias sin cultivar (P39) y otras no secuenciadas (P5, P9, P14 y P44).

Por otro lado, se observó la separación de un grupo muy amplio de bandas situadas en los cuadrantes inferiores del gráfico donde se localizan los puntos GU2 y GU3 marcados como grupo C, con altas concentraciones de nutrientes (NID y PRS), conductividad y caudal. Las posiciones de bandas encontradas se correspondieron según sus secuencias al género *Phormidium*, en concreto al genotipo B (P47) y C (P35) según el análisis filogenético (Fig. 49). También se observaron posiciones cuyas bandas se identificaron como *Synechococcus elongatus* (P37), *Leptolyngbya boryana* (P27 y P34), *Pseudanabaena catenata* (P27 y P49), *Aphanocapsa rivularis* (P12) y por último, *Chamaesiphon* sp., pertenecientes al genotipo C (P19). A la derecha de este grupo, se localizaron una serie de posiciones (grupo D), relacionadas con un aumento en la temperatura, cuyas bandas se identificaron como *Pleurocapsa minor* (P2 y P23), *L. nostocorum* (P33), *Aphanocapsa muscicola* (P45) y *Chamaesiphon* sp., pertenecientes al genotipo B (P17). Por último, se podría destacar aquellas posiciones de bandas situadas en el centro del gráfico cuya distribución no se puede definir en un punto de muestreo concreto, habiéndose encontrado posiblemente en todas ellas. Las bandas fueron identificadas como *Pseudanabaena catenata* (P48), *Aphanocapsa rivularis*

(P20), *Aphanocapsa muscicola* (P46), *Chamaesiphon* sp. pertenecientes al genotipo B (P11 y P22) y al genotipo A1 (P21, P6 y el más alejado, P7).

Con el objetivo de sintetizar toda la información obtenida tanto de los análisis de los perfiles genéticos, filogenéticos y de correspondencia canónica, a continuación se muestran los geles en detalle de cada estación de muestreo con aquellas alturas que han podido ser secuenciadas (Figs. 52 y 53). De tal manera podemos definir los patrones de bandas obtenidos inicialmente indicando a cada posición o altura las correspondientes cianobacterias encontradas a partir de sus secuencias. De las 53 posiciones halladas en todos los geles procesados, se han podido secuenciar un total de 42.

Así, en las figuras se han agrupado con un cuadrado negro en la parte superior, aquellas posiciones que se corresponden con los distintos genotipos pertenecientes al género *Chamaesiphon* (posiciones 1, 3, 6, 7, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25, 40, 41 y 42). Dentro de esta misma zona, se localizaron otras posiciones correspondientes a las especies *Aphanocapsa rivularis* (P12), *A. muscicola* (P45 y P46) y *Pleurocapsa minor* (P2 y P23), todas ellas pertenecientes al orden Chroococcales. Todas ellas se localizaron en todos los puntos, pero mayoritariamente se observaron en el punto GU1 y en menos abundancia en GU2 y GU3, excepto la banda correspondiente a *A. rivularis* encontrada.

Las posiciones encontradas en la parte inferior de las figuras se corresponden con aquellas bandas pertenecientes al orden Oscillatoriales, a excepción de la posición 37 (posicionada solamente en GU2 y GU3) cuya banda se identificó como *Synechococcus elongatus* según el análisis filogenético. El resto de las posiciones pertenecieron a distintos géneros como se indica a continuación. En las posiciones 50 y 51 se identificaron cuatro bandas correspondientes al género *Phormidium*, en concreto al genotipo A (Fig. 49), encontradas en el punto GU1, y en menor proporción en el GU2. Las posiciones 48 y 49 se identificaron como *Pseudanabaena catenata*, apareciendo en todos los puntos de muestreo. Cercanas a estas últimas se localizaron las posiciones 27 y 34 correspondientes a *Leptolyngbya boryana* en todos los puntos, pero mayoritariamente en GU2 y GU3. En cuanto a las posiciones 30 y 33 se correspondieron con la especie *Leptolyngbya nostocorum*, encontradas únicamente en el punto GU1. Por último, en la posición 35 se encontró una banda correspondiente al género *Phormidium*, en concreto al genotipo C, localizado en GU2 y con mayor abundancia en GU3.

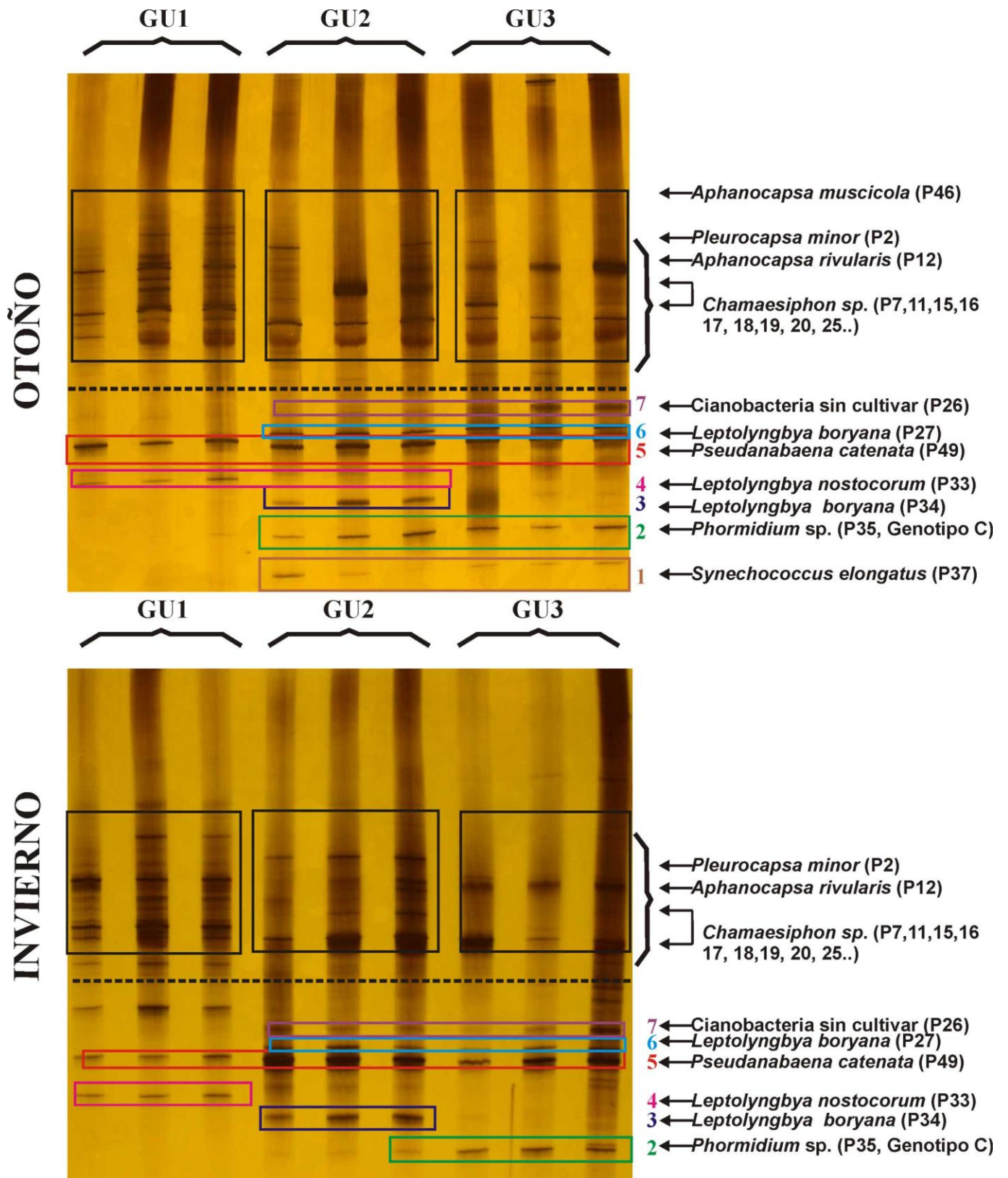


Figura 52. Perfiles genéticos realizados con geles de TGGE representando cada punto de muestreo (GU1, GU2 y GU3) en las estaciones de otoño e invierno.

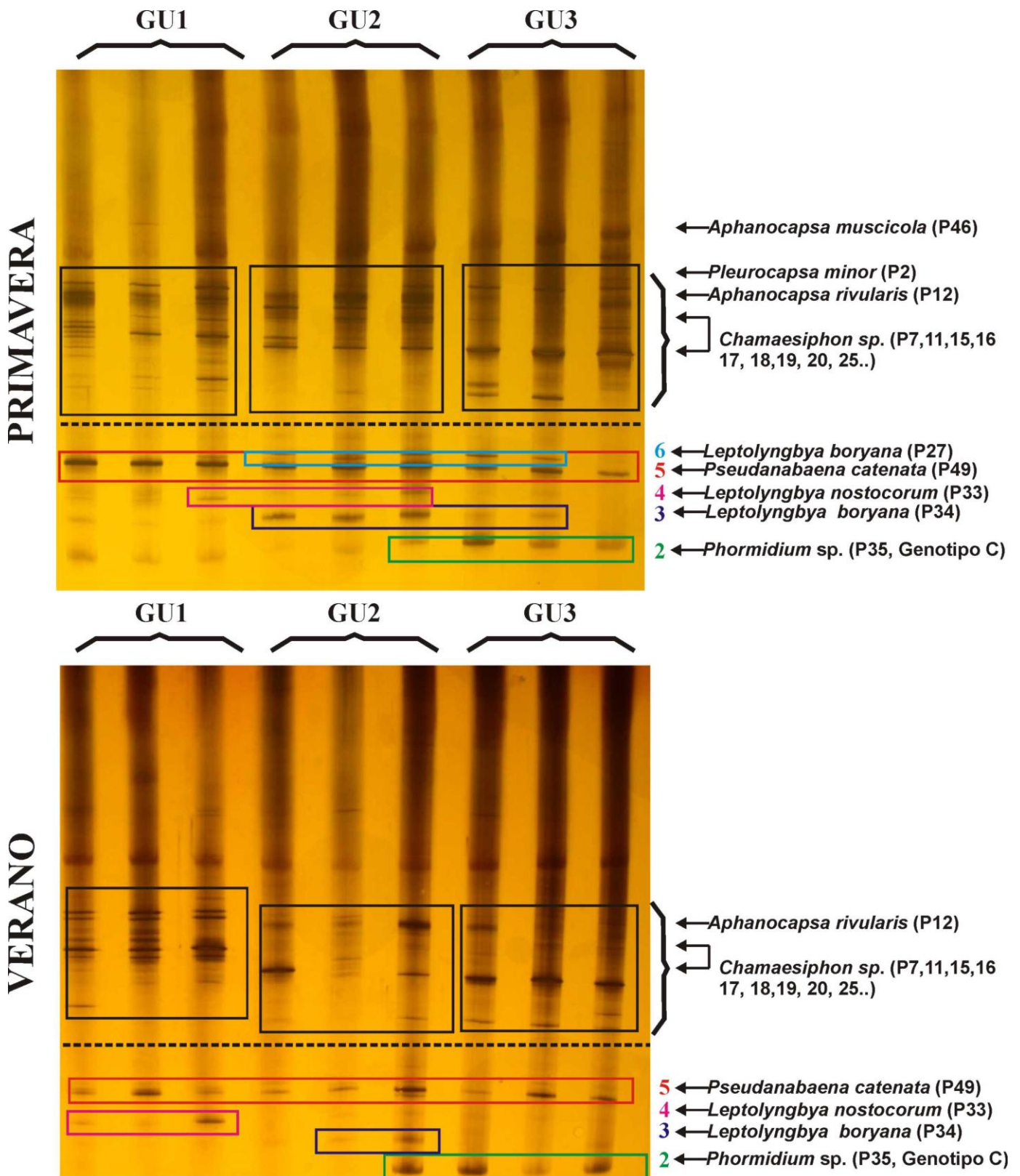


Figura 53. Perfiles genéticos realizados con geles de TGGE representando cada punto de muestreo (GU1, GU2 y GU3) en las estaciones de primavera y verano.

III.6. Discusión.

El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios de la estructura y composición de comunidades bentónicas de cianobacterias del río Guadarrama bajo un gradiente de eutrofización aguas abajo. Esto fue llevado a cabo mediante la exploración de los perfiles genéticos por TGGE del gen ARNr 16S del epiliton, secuenciación y análisis de datos. En nuestro análisis se encontraron distintos genotipos presentes en las comunidades de cianobacterias en cada punto de muestreo generando unos patrones o perfiles de bandas característicos en cada punto. Este patrón de bandas representa una huella genética de la comunidad, la cual nos permite realizar comparaciones directas entre las distintas muestras.

Los análisis de agrupamiento realizados con los perfiles genéticos mostraron en primer lugar, diferencias entre los puntos de muestreo y también, a nivel estacional. En segundo lugar, se observó una disminución de la diversidad de las comunidades de cianobacterias aguas abajo, tal y como se observaron en estudios previos realizados en este río (Rodríguez y col., 2007). Esta reducción de la diversidad se vio correlacionada con un incremento en la carga de nutrientes, probablemente en relación con la ausencia de especies sensibles que fueron desplazadas en las localidades más contaminadas por genotipos más competitivos.

El análisis filogenético de las distintas bandas, separó distintos grupos que se correspondieron con genotipos de distintos puntos de muestreo relacionados a su vez con distinta calidad del agua. Así, dentro el grupo del *Chamaesiphon* se podía distinguir ciertos genotipos característicos que aparecieron solamente en el punto GU1. Sin embargo, otros procedieron de los puntos de muestreo aguas abajo de características eutróficas-hipetróficas. Esto ocurría de igual manera con distintos genotipos de *Phormidium*, que se correspondieron con especies de distintas de condiciones tróficas. Por otra parte, las bandas cuyas similitudes se correspondían con la secuencia obtenida para el aislado *Leptolyngbya nostocorum*, se encontraron solamente en el GU1, a diferencia de las bandas correspondientes a *L. boryana* que aparecieron aguas abajo. De la misma manera, se encontraron distintos genotipos, que no se pudieron asociar con ningún morfotipo determinado por no encontrarse secuencias similares en la bases de datos ni en los cultivos (Fig. 49, grupo cianobacterias sin cultivar), pero si parecen mostrar una distribución diferencial. Se encontraron un grupo de bandas que aparecieron principalmente aguas arriba, y otro que apareció aguas abajo. Estos resultados reflejaron inicialmente, posibles diferencias en la estructura y composición

de las comunidades de los distintos puntos de muestreo, así como la diferenciación de genotipos según sus exigencias ecológicas. Así, nuestros resultados observados en los análisis multivariantes (CA y CCA) confirmaron las diferencias en los perfiles genéticos (patrones de bandas) entre los puntos de muestreo con diferencias en el estado trófico de las aguas. Esas diferencias encontradas en los perfiles se reflejaron en cambios tanto en la estructura como en la composición de las comunidades de cianobacterias. En concreto, el punto aguas arriba (GU1) presentó una comunidad de cianobacterias con un gran número de individuos pertenecientes al orden Chroococcales cuya presencia ha sido descrita en ambientes de características oligotróficas (Douterelo y col., 2004; Perona y Mateo, 2006; Dorador y col., 2008; Morales, 2010; Carmona y col., 2011), en concreto formado por genotipos identificados como *Chamaesiphon* (genotipo A) en gran proporción, *Aphanocapsa muscicola* y *Pleurocapsa minor*. El número de representantes pertenecientes al orden Oscillatoriales fue menor, con la presencia de genotipos identificados como *Leptolyngbya nostocorum* y del género *Phormidium* perteneciente al genotipo A, según el análisis filogenético realizado. Por el contrario, en los puntos situados aguas abajo (GU2 y GU3) y en mayor proporción en el GU3, se observaron una mayor abundancia de cianobacterias pertenecientes al orden Oscillatoriales como son los genotipos identificados como *Pseudanabaena catenata*, *Leptolyngbya boryana* y representantes del género *Phormidium*, en concreto al genotipo B y C, confirmando los resultados de los análisis filogenéticos. Además, también se encontraron la presencia de algunas cianobacterias del orden Chroococcales como *Synechococcus elongatus* y *Aphanocapsa rivularis* las cuales también aumentan su abundancia en ambientes eutróficos (Douterelo y col., 2004; Morales, 2010; Carmona y col., 2011). Estos resultados concuerdan con los observados en el capítulo 1 relativo a la abundancia de las especies observadas al microscopio y en placa de las muestras del raspado del epilíton, y a su vez, con los resultados previos encontrados en trabajos anteriores que observaron cambios en la estructura y composición en la comunidades de cianobacterias bajo un gradientes de eutrofización (Perona y col., 1998, 1999; Douterelo y col., 2004). La abundancia de las cianobacterias depende en gran medida de factores climáticos y ambientales. Si se consigue entender los factores que regulan su presencia, se utilizaría como base en el control de su abundancia y su posible uso como indicadores del estado trófico del agua. En nuestro estudio, se han observado genotipos (relativos a los géneros *Chamaesiphon*, *Phormidium*) que han mostrado variaciones en la respuesta a variables ambientales como el caudal, la concentración de nutrientes (NID

y PRS), así como a las variaciones en el oxígeno disuelto. Estos resultados coinciden con aquellos observados en estudios realizados en lagos eutróficos (Rajaniemi-Wacklin y col., 2008; Schiaffino y col., 2009) y en trabajos similares en ríos (Figueiredo y col., 2007; Anderson-Glenna y col., 2008) donde se han observado la dominancia de grupos de distintos genotipos principalmente relacionadas con nutrientes (NID y PRS) así como con el oxígeno disuelto.

Por otra parte, los resultados obtenidos con la técnica molecular de “fingerprinting” o huella genética, han mostrado una mayor diversidad que las observaciones morfológicas realizadas a través de microscopía, tal y como ya se ha observado anteriormente en otros estudios (Nübel y col., 1997; Taton y col., 2003; Turicchia y col., 2005). Las secuencias obtenidas mediante la técnica TGGE, en general se correspondieron con las cianobacterias encontradas en las observaciones microscópicas de las muestras naturales. Sin embargo, aunque el análisis de TGGE mostró la mayoría de los morfotipos más abundantes de las muestras naturales procedentes del epilíton, existió un grupo de cianobacterias pertenecientes al orden Nostocales que no se apreció mediante TGGE, y sí en las observaciones al microscopio. La causa de esta pérdida de información puede ser debido, entre otras limitaciones, a la presencia de abundante mucílago rodeando a los filamentos y colonias, tal y como revelaron tanto las observaciones microscópicas y los correspondientes aislados, que dificulta en gran medida la extracción de ADN, fenómeno también observado en otros estudios de comunidades de cianobacterias en suelos polares (Taton y col., 2003; Turicchia y col., 2005). También puede ser debido a que las posibles bandas correspondientes a las cianobacterias heterocistasas, fueran muy finas e imposibles de extraer como se ha observado en otros estudios de fijación de nitrógeno en suelos degradados (Maestre y col., 2006). Otra de las razones probables podría ser que la presencia de algunas de las especies heterocistasas es menor del 1%, valor que se corresponde con el límite de detección de la TGGE (Muyzer y col. 1993). De igual manera, el análisis de las comunidades basándonos sólo en las técnicas clásicas de identificación morfológica, ofrece resultados parciales debido a que muchos morfotipos son difíciles de visualizar y de identificar en las muestras naturales y también, complicados de aislar en el laboratorio. En nuestro estudio, se encontraron cinco genotipos pertenecientes al género *Chamaesiphon*, mientras que en las identificaciones morfológicas realizadas al microscopio sólo se identificaron dos morfotipos. Por otra parte, gracias al aislamiento de algunas especies descritas en el capítulo 1 con el fin de

realizar estudios fisiológicos, ha sido posible la identificación de muchas de las bandas, hecho que no siempre sucede con éxito (Casamayor y col., 2000). Dadas las limitaciones de ambas técnicas, hay que destacara la importancia de integrar tanto la información morfológica como molecular, con el fin de tener una visión más completa de la comunidad de estudio.

Desde un punto de vista ecológico, es muy importante relacionar si los mismos aislados son representantes dominantes en el medio, o al contrario, si son individuos minoritarios, lo que supone una información imprescindible para el seguimiento de cambios en la composición de las comunidades. Sin embargo según las bases de datos, se encontró un gran número de bandas correspondientes a cianobacterias y bacterias sin cultivar, como se ha observado en muchos trabajos que han aplicado la técnica TGGE/DGGE (Tuomainen y col., 2006; Roeselers y col., 2007; Dorador y col., 2008; Lemke y col., 2009). Esto podría ser debido a la escasa información de identificación de especies, debido al hecho de que los organismos que han podido ser aislados y cultivados hasta la fecha representan sólo una pequeña fracción de la diversidad microbiana (Ward y col. 1990; Felske y col. 1998). Esto resalta de nuevo la necesidad de estas técnicas integrando la información morfológica de los individuos para facilitar el trabajo de descripción de comunidades microbianas.

Cabe destacar la importancia de los estudios polifásicos en los análisis de comunidades de cianobacterias con el fin de integrar toda la información, tanto fenotípica como genotípica, y aportaciones sobre la ecología de los componentes de las mismas. Esta información en nuestro caso, puede ser aplicada en la biomonitorización de la calidad del agua en los ríos. Los estudios realizados en aguas continentales basados en diversidad de cianobacterias mediante técnicas moleculares, se centran en su mayoría en ambientes lénticos como lagos y embalses (Casamayor y col., 2000; Boutte y col., 2005; Rajaniemi-Wacklin y col., 2008; Schiaffino y col., 2009). Mientras, los estudios realizados en ríos son más escasos (Dorador y col. 2008), si bien, van incrementándose aquellos basados en comunidades bacterianas en biofilms (Brümmer y col., 2003; Roeselers y col., 2007; Anderson-Glenne y col., 2008; Lemke y col., 2009).

Actualmente, existen estudios basados en comparaciones de comunidades microbiológicas en biofilms en ríos, con el fin de evaluar y caracterizar las respuestas ecológicas de dichas comunidades según la calidad de las aguas (Vinten y col., 2011). Los biofilms bentónicos en ríos están compuestos por comunidades muy diversas

(algas, bacterias, cianobacterias) adheridas a diversos sustratos. Existen muchos factores que afectan a su composición como la adición de nutrientes en río oligotróficos (McCormick y Stevenson, 1991; Slavik y col., 2004; Stevenson y col., 2008), temperatura (Olapade y Leff, 2004), caudal (Besemer y col., 2007), intensidad de la luz (Franken y col., 2005), entre otros, que afectan al crecimiento y a la estructura de la comunidad del biofilm. Los parámetros físico-químicos como la concentración de nutrientes (OECD, 1982; USEPA, 2000; Directiva 2000/60/CE) son poco concluyentes para justificar su uso exclusivo en la predicción del estado ecológico. Los estudios basados en la composición de los biofilms son una herramienta más robusta a la hora de reflejar el estado ecológico de las aguas. Varios autores apoyan el uso de técnicas moleculares (perfiles genéticos de las comunidades) en paralelo, junto con otro tipo de análisis (pigmentos, fotosíntesis, riqueza específica, etc.) para la estimación del estado trófico de las aguas (Biggs y Smith, 2002; Dorigo y col., 2005; Ricart y col., 2009). Como se ha comentado en la introducción de este trabajo, existen numerosos índices para la evaluación de la calidad de las aguas, en concreto el más utilizado es el índice trófico basado en diatomeas (TDI) que supone un tiempo considerable en su aplicación, y sólo se considera un componente de la comunidad bentónica (Vinten y col., 2011).

Las técnicas de PCR junto con TGGE/DGGE son herramientas muy útiles que permiten obtener una visión global de la diversidad en comunidades microbianas con numerosas muestras (Ferrari y Hollybaugh, 1999), y particularmente con juegos de cebadores específicos (Díez y col., 2007). Varios estudios han demostrado que la exploración de clones por DGGE o TGGE es una fórmula eficiente y conveniente para detectar y recuperar las secuencias predominantes en una muestra (Felske y col., 1998; Bano y Hollibaugh, 2000). Sin embargo, se han discutido ciertas limitaciones que pueden producir sesgos en los análisis y por tanto, una interpretación errónea de los datos, como por ejemplo, extracción ineficiente del ADN, formación de artefactos en la PCR, la amplificación diferencial de aquellas especies cuyo ADN es el más abundante o co-migración de fragmentos diferentes de ADN (Wintzingerode y col., 1997; Sekiguchi y col., 2001; Becker y col., 2000; Kisand y Wikner, 2003; Nikolausz y col., 2005). En el presente estudio se han minimizado dichos sesgos empleando un método de extracción de ADN específico de suelos modificado para cianobacterias bentónicas, posterior purificación del extracto, amplificación con cebadores específicos de cianobacterias (Boutte, y col., 2006) y análisis de los productos resultantes en búsquedas de artefactos. Dado que empleando la técnica TGGE, amplicones con

idéntica longitud migran en función de su estructura primaria y composición nucleotídica específica, las bandas con idéntica movilidad electroforética fueron definidas como pertenecientes al mismo genotipo/especie (Heuer y col., 1997; Díez y col., 2001). En el presente estudio se recortaron y amplificaron un mínimo de tres bandas situadas a la misma altura, con el fin de confirmar que su posición, debido a posibles co-migraciones de distintos fragmentos, era fiable tanto en el mismo gel como en distintos. Las similitudes encontradas entre secuencias posicionadas a la misma altura fueron entre el 99-100% y en la mayoría de las bandas obtuvimos secuencias casi idénticas también en el seguimiento temporal de las comunidades, indicando que las bandas que tenían la misma posición en los geles se correspondían con un mismo genotipo, tal y como ha sido descrito también en otros estudios (Casamayor y col., 2002; Roeselers y col., 2007; Schiaffino y col., 2009). Los resultados de este estudio han confirmado mediante TGGE diferencias en la diversidad en las comunidades epilíticas de cianobacterias en el río Guadarrama bajo un gradiente de eutrofización, con resultados muy similares encontrados en estudios realizados en paralelo en el río Guadalix, dentro de la comunidad de Madrid (Morales y col., 2010). De igual manera, se ha observado la influencia de las variables ambientales en la composición de la comunidad de dichos organismos, que se podría traducir en respuestas a cambios del estado trófico de las aguas. Se podría concluir que los resultados obtenidos de los distintos perfiles realizados con la técnica TGGE, reflejaron en gran medida los resultados tanto de microscopía como de cultivo de las muestras estudiadas, así como el análisis filogenético. De igual manera, se pudo comprobar en todas las estaciones analizadas un descenso en la diversidad aguas abajo, en relación con un aumento en la eutrofización a lo largo de los puntos de muestreo. Por lo tanto, se podría considerar esta técnica molecular una herramienta válida, al mostrar diferencias claras en la diversidad de las comunidades de cianobacterias y, complementar las técnicas clásicas utilizadas en estudios de biomonitorización de la calidad del agua en ríos.

IV. Estudio polifásico de muestras naturales y cepas aisladas de los géneros *Phormidium* y *Oscillatoria*

IV. ESTUDIO POLIFÁSICO DE MUESTRAS NATURALES Y CEPAS AISLADAS DE LOS GÉNEROS *PHORMIDIUM* Y *OSCILLATORIA*.

IV.1. Introducción.

Como se ha comentado en la introducción, las cianobacterias son microorganismos ampliamente distribuidos y se encuentran abundantemente tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres (Whitton y Potts, 2000). Miembros del Orden Oscillatoriales, especialmente aquellos del género *Phormidium* Kützinger ex Gomont 1892, tienen una distribución geográfica muy amplia y comprenden a la vez morfotipos muy variados, los cuales son dominantes en tapetes microbianos tanto en agua como en suelos (Komárek y Anagnostidis, 2005). Se ha sugerido que la variabilidad entre los distintos morfotipos puede ser debido a distintas adaptaciones a diferentes condiciones ambientales (composición en nutrientes, caudal, pH, temperatura, etc.) incluyendo diferencias en aspectos bioquímicos y fisiológicos. La distinción de grupos dentro del orden Oscillatoriales ha preocupado durante mucho tiempo a los taxonomistas, especialmente cuando se observó que los caracteres empleados para distinguir estos géneros (por ejemplo la presencia o ausencia de vainas, vacuolas de gas, tricomas atenuados hacia el final, forma de las células terminales) están normalmente influenciados por las condiciones ambientales (Whitton, 2002). Se han realizado numerosos intentos empleando criterios morfológicos, ultraestructurales, contenido de pigmentos o análisis de las secuencias de ADNr 16S para solucionarlo (Casamatta y col., 2005; Porta y Hernández-Mariné, 2005; Marquardt y Palinska, 2007; Palinska y Marquardt, 2008), pero su taxonomía se sigue considerando hoy en día problemática.

Komárek y Anagnostidis (2005) basándose en criterios morfológicos, citológicos y ultraestructurales realizaron una profunda revisión del grupo y definieron nuevos géneros, algunos de los cuales también se han aceptado en la última versión del *Bergey's Manual* (2001), sin embargo, no aparecen otros géneros como *Schizothrix* y *Phormidium*. Castenholz y col. (2001) basándose en los análisis de las secuencias de ADNr 16S mostró que el grupo de Oscillatoriales no es coherente filogenéticamente, habiendo géneros polifiléticos como el de *Oscillatoria*.

Muchos autores consideran de gran importancia integrar estudios morfológicos tradicionales junto con análisis genéticos (estudios polifásicos) para resolver las cuestiones taxonómicas tan controvertidas (Wilmotte, 1994; Komárek y Kastovský, 2003; Garcia-Pichel y col., 2001; Taton y col., 2006).

El objetivo de este apartado se centra en el estudio polifásico tanto de muestras naturales como de cultivos aislados procedentes de distintos ríos (Guadarrama, Guadalix, Manzanares y el arroyo Mediano) ubicados en la Comunidad de Madrid. Se pretende caracterizar, tanto a nivel morfológico y genético, la diversidad de distintas poblaciones en su mayoría del género *Phormidium*, representativas de los ríos de la región de Madrid.

IV.2. Características físico-químicas de los ríos.

Para llevar acabo los objetivos de este estudio, se muestrearon cinco puntos de referencia de los ríos Guadarrama, Guadalix, Manzanares y el arroyo Mediano localizados en la Comunidad de Madrid, con distinta calidad del agua de acuerdo a su estado trófico. La descripción de las características físico-químicas de cada punto de muestreo se resume en la tabla 15. Se observaron claras variaciones en el contenido en nutrientes entre las diferentes aguas analizadas en este estudio.

Los niveles mayores de nutrientes se encontraron en el río Guadarrama (punto GU3) seguido por los valores del río Guadalix (GLX3), Manzanares, Guadalix-GLX1 (en la cabecera del río) y finalmente con los valores más bajos, corresponden al arroyo Mediano. Las concentraciones más altas de P-PO_4^{3-} (PRS) fueron detectadas en el punto de muestreo del río Guadarrama (GU3), las cuales pudieron ser atribuidas a vertidos tanto de origen doméstico como agrícola. También se detectaron valores elevados de N-NH_4^+ y N-NO_3^- indicando posiblemente la presencia continua de vertidos en esta área en concreto.

Otras diferencias a destacar en relación con las diferencias en la calidad de las aguas son las relativas a los valores de oxígeno disuelto encontrados en los distintos puntos de muestreo. Los valores más elevados se correspondieron con los ríos Manzanares y Mediano, seguido del punto aguas arriba del río Guadalix. Los valores más bajos fueron encontrados en el río Guadarrama seguido del río Guadalix, ambos aguas abajo. De igual manera, y también en relación con los distintos niveles de concentración, los valores de conductividad encontrados fueron diferentes, encontrándose los valores más altos en los ríos Guadarrama y Guadalix aguas abajo, y los valores más bajos en los puntos de muestreo de los ríos Mediano y Manzanares seguido del río Guadalix aguas arriba. Los valores de pH se encontraron dentro de la neutralidad y los valores de temperatura dependieron de la estación climatológica.

Tabla 15. Principales características físico-químicas del agua en cada punto de muestreo en los ríos Guadarrama, Guadalix, Manzanares y arroyo Mediano.

	Río Guadarrama	Río Guadalix		Río Manzanares	Arroyo Mediano
		GLX1 (aguas arriba)	GLX3 (aguas abajo)		
Temperatura del agua (°C)	18.6	12	14	3.3	9.7
Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	640	73	515	13.5	16.5
Oxígeno disuelto (% saturación)	70.3	103	89.7	105	105
pH	6.7	6.3	7.8	7.5	7.5
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	2.75	0.2	1.25	0.97	0.02
N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	0.15	0.002	0.061	0	0
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	2.95	0.085	0.185	0	0
P-PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	0.8	0.04	0.5	0.1	0
Dureza (mg Ca ²⁺ L ⁻¹)	97	152	11	4.3	4.2

El valor más bajo se encontró en el punto de muestreo aguas arriba del río Manzanares, localizada en zona de montaña.

De acuerdo con estos resultados, se estableció el estado trófico de cada uno de los puntos analizados según el límite de fósforo reactivo soluble (PRS) descrito por distintos autores (Álvarez-Cobelas, 1992; Kelly y Whitton, 1998). Así, se localizaron distintas condiciones ambientales designadas como hipertróficas en el punto aguas abajo en el río Guadarrama, eutróficas en el río Guadalix aguas abajo, mesotróficas en el río Manzanares, condiciones oligo-mesotróficas en el río Guadalix aguas arriba, y por último condiciones oligotróficas en el arroyo Mediano.

IV.3. Caracterización morfológica y ultraestructural.

Se llevó a cabo una caracterización a nivel morfológico de siete tapetes de cianobacterias recogidos en los ríos descritos anteriormente y de seis cepas aisladas a partir de dichas muestras. Las observaciones microscópicas (Fig. 54 y Fig. 55) confirmaron su posición taxonómica dentro del Orden Oscillatoriales, y en su mayoría pertenecientes al género *Phormidium*, aunque se encontraron representantes del género *Oscillatoria* entre uno de los tapetes formado mayoritariamente por distintas cepas del género *Phormidium*. Las características morfológicas estudiadas (dimensiones celulares, forma de la célula apical, presencia de caliptra, etc.) se resumen en la tabla 16. El estudio morfológico permitió identificar cinco morfotipos distintos, los cuales se describen a continuación.

El morfotipo más abundante (Morfotipo I, Fig.54, A-F) se observó en los tapetes recogidos en los ríos Manzanares, así como en el Guadalix y Guadarrama (tapete *Phormidium* GU3), ambos aguas abajo, así como en las cepas *Phormidium* 2TGU3 (aislado a partir del tapete del Guadarrama aguas abajo) y *Phormidium* BGU3 aislado previamente del raspado del biofilm del mismo punto de muestreo cuatro años antes (Fig. 54, fotos D y E-F, respectivamente). Dichas muestras presentaron una morfología muy similar, con variaciones en el ancho celular definido en un rango entre 5.8 a 8 μm , con células no constrictas, forma cónica de las células apicales, y con la presencia de vaina y caliptra, que se podría corresponder con las características taxonómicas descritas para *Phormidium autumnale*. Sin embargo, en los resultados de microscopía electrónica (MET) se observaron diferencias ultraestructurales principalmente en la disposición de los tilacoides en tres representantes de dicho morfotipo (Fig. 55).

Figura 54. Morfología de los tapetes encontrados y las cepas aisladas. (A) *Phormidium* MNZ; (B) *Phormidium autumnale* GLX3; (C) *Phormidium* BGU3 visto en el tapete (D) *Phormidium* 2TGU3 UAM 396; (E) *Phormidium* BGU3, primer aislamiento y (F) el aislado en su morfología actual; (G, H e I) *P. terebriforme* visto en el tapete y los dos aislados 3TGU3 y 5TGU3, respectivamente. Escala=10 μ m.

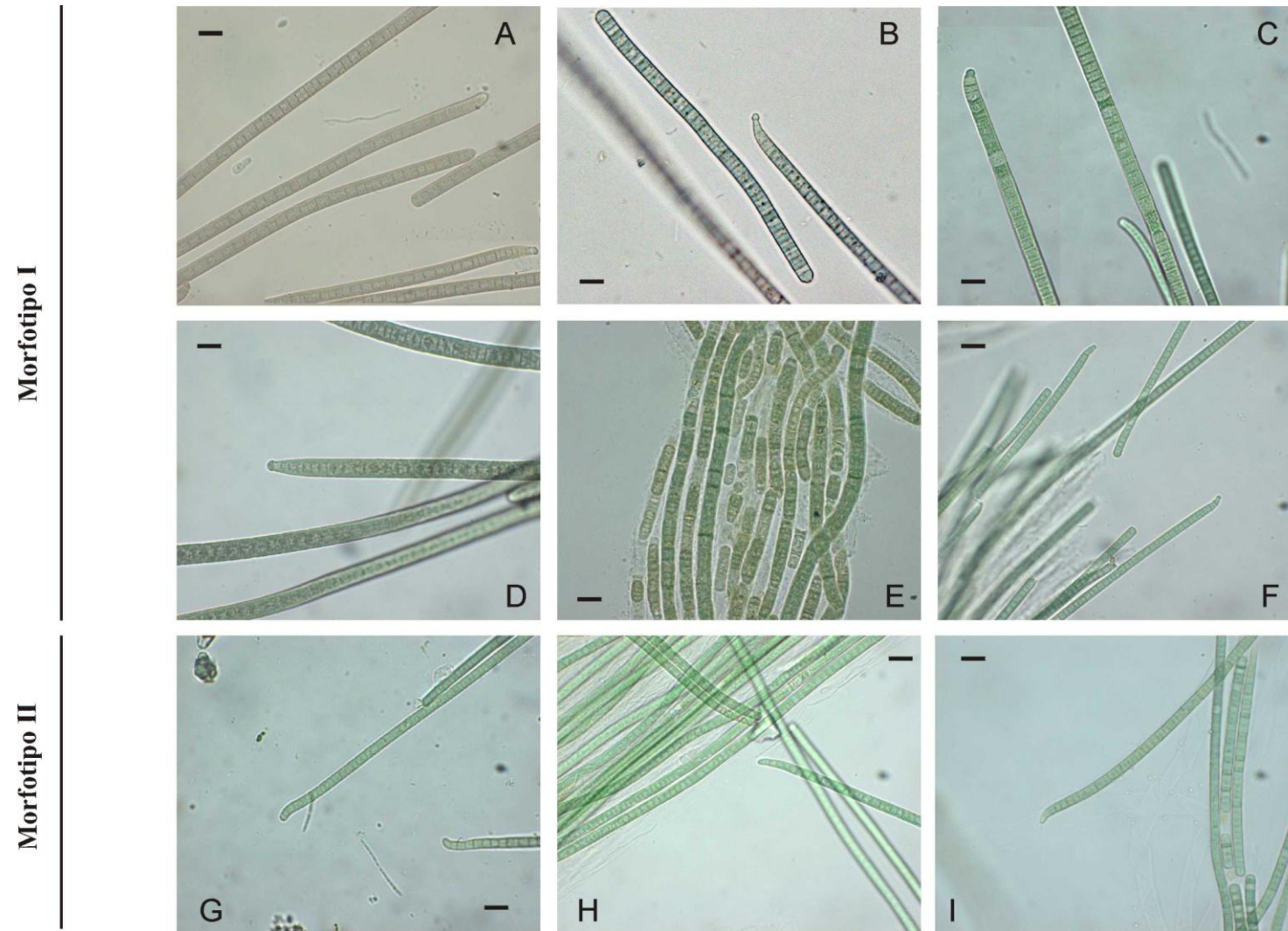


Figura 54. Continuación. (J, K y L) *Oscillatoria tenuis* vista en el tapete, y los dos aislados 1TGU3 y 4TGU3, respectivamente; (M-N) Tapete *P. aerugineo-caeruleum* MED; (O) Tapete *P. aerugineo-caeruleum* MNZ; (P) Tapete *Phormidium corium* MED; (Q y R) Tapete *Phormidium corium* GLX1. Escala=10 µm.

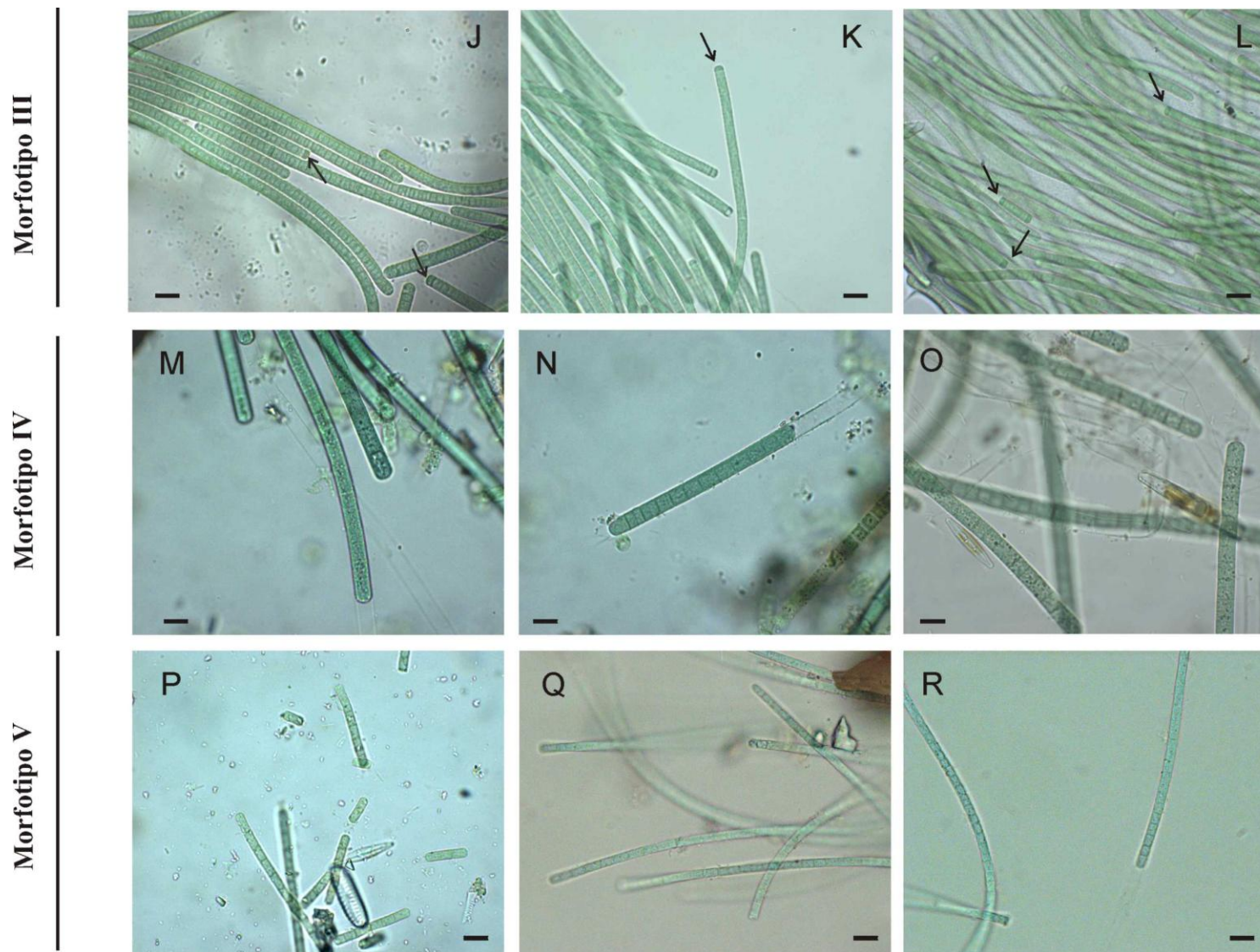


Tabla 16. Características morfológicas de las distintas muestras naturales y cepas aisladas en este estudio procedentes de distintos ríos de la Comunidad de Madrid.

Muestra	Nº Cultivo*	Origen geográfico	Ancho celular (µm)	Largo celular (µm)	Forma célula apical	Caliptra	Color	Grupo filogenético	Calidad del agua
Muestras naturales (Tapetes)									
<i>Phormidium</i> GU3	-	Río Guadarrama	7-8	4-6	Cónica		Marrón-Verde	Ia	Hipertrófico
Morfotipo I	-		3.3-4.8	1.8-2.6	Curvada		Verde azulado	II	
Morfotipo II	-		3.5-5.8	1.3-2	Achatada		Verde azulado	III	
Morfotipo III	-								
<i>Phormidium autumnale</i> GLX3	-	Río Guadalix (Aguas abajo)	5.8-6.6	2.6-3.7	Cónica	+	Verde azulado	Ic	Eutrófico
<i>Phormidium</i> MNZ	-	Río Manzanares	5.2-6.4	2.3-6	Cónica	+	Marrón	Ib	Mesotrófico
<i>Phormidium aerugineo-caeruleum</i> MED	-	Arroyo Mediano	6-7	6-8	Redondeada	-	Verde azulado	IV	Oligotrófico
<i>Phormidium aerugineo-caeruleum</i> MNZ	-	Río Manzanares	6-7	7-8.8	Redondeada	-	Verde azulado	IV	Mesotrófico
<i>Phormidium corium</i> MED	-	Arroyo Mediano	3-4.2	4-7	Redondeada	-	Verde azulado	V	Oligotrófico
<i>Phormidium corium</i> GLX1	-	Río Guadalix (cabecera)	2.8-3.8	3-4.3	Redondeada	-	Verde oscuro	V	Oligo-mesotrófico
Cepas aisladas									
<i>Phormidium</i> BGU3	UAM 361	Río Guadarrama	5-6.7	2.3-5.3	Cónica	+	Verde azulado	Ia	Hipertrófico
<i>Phormidium</i> 2TGU3	UAM 396	Río Guadarrama	6.6-8	3.3-6.6	Cónica	+	Marrón	Ia	Hipertrófico
<i>Phormidium terebriforme</i> 3TGU3	UAM 408	Río Guadarrama	3.3-4.8	1.8-2.6	Curvada	-	Verde azulado	II	Hipertrófico
<i>Phormidium terebriforme</i> 5TGU3	UAM 409	Río Guadarrama	3.3-4.8	1.8-2.6	Curvada	-	Verde azulado	II	Hipertrófico
<i>Oscillatoria tenuis</i> 1TGU3	UAM 410	Río Guadarrama	3.5-5.8	1.3-2	Achatada	-	Verde azulado	III	Hipertrófico
<i>Oscillatoria tenuis</i> 4TGU3	UAM 411	Río Guadarrama	3.5-5.8	1-2	Achatada	-	Verde azulado	III	Hipertrófico

*UAM, Colección de cultivos UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

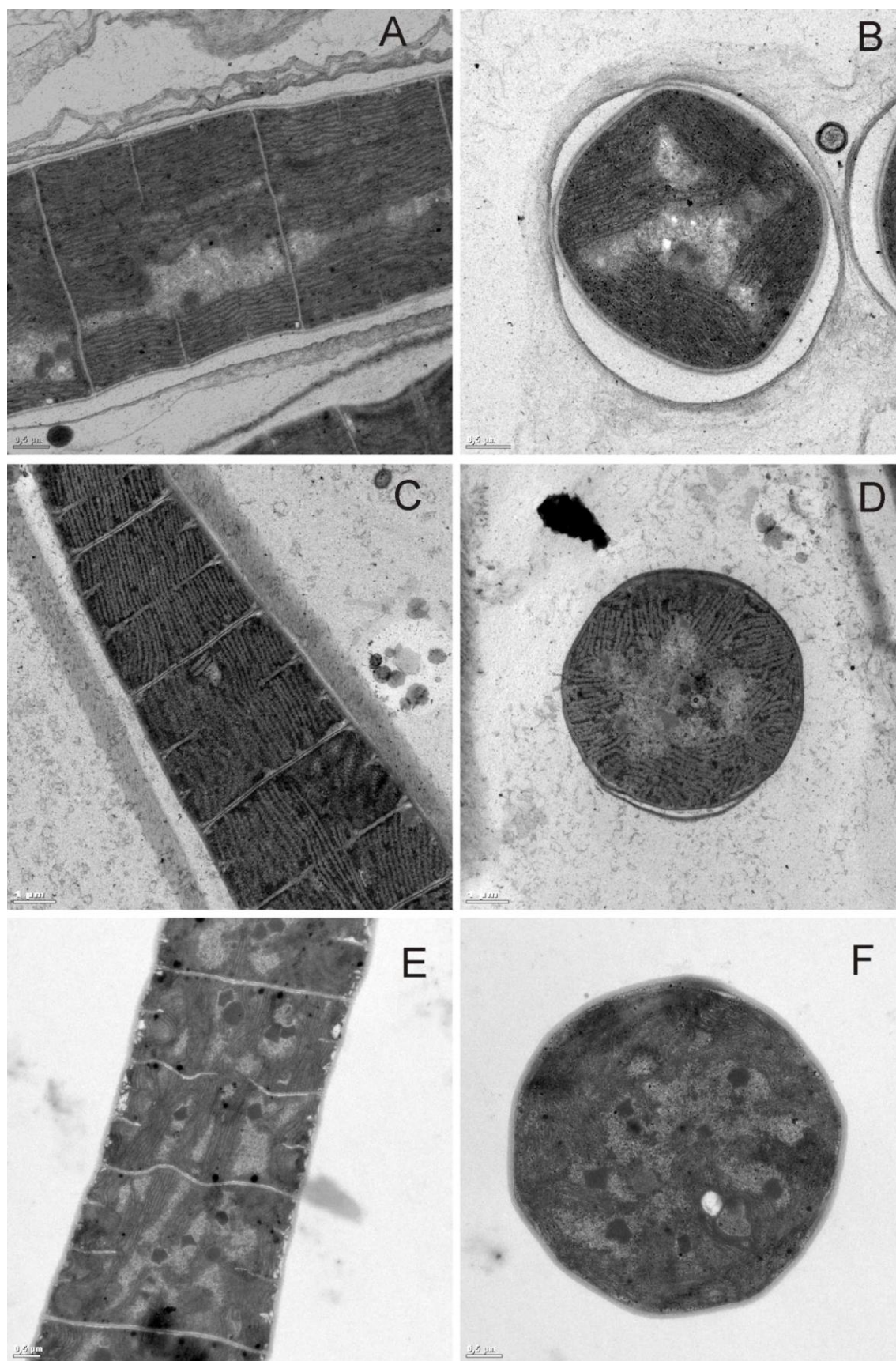


Figura 55. Microfotografías de la ultraestructura realizadas por microscopía electrónica de transmisión (MET) de los aislados *Phormidium* BGU3 (A-B), *Phormidium* 2TGU3 (C-D) y de la muestra natural correspondientes a *Phormidium autumnale* GLX3 (E-F).

En el caso de los aislados *Phormidium* BGU3 y *Phormidium* 2TGU3, los tilacoides mostraron, en su mayoría, una disposición fascicular, organizados en paralelo al eje longitudinal del filamento (Fig. 55, fotos A-B y C-D, respectivamente) y con una disposición radial de los mismos en la sección transversal (Fig. 55, B-D). Sin embargo, el tapete del río Guadalix aguas abajo, presentó tricomas ligeramente más finos (5.8-6 μm) con los tilacoides dispuestos mayoritariamente formando pequeños grupos orientados de manera irregular tanto en el eje longitudinal del filamento (Fig. 55, E-F) como en la sección transversal (Fig. 55, F).

El segundo morfotipo (Morfotipo II, Fig. 54, G-I) fue observado también en el tapete de *Phormidium* del río Guadarrama aguas abajo (Tabla 16), y en los dos aislados a partir de este mismo tapete (*Phormidium* 3TGU3 y *Phormidium* 5TGU3). Dicho morfotipo presentó células apicales gradualmente atenuadas y curvadas en forma de garfio, sin caliptra. Los filamentos verde azulados presentaron una ligera constricción celular, con una media de ancho celular de 4 μm , con la presencia de necridios, todo rodeado por una vaina muy fina. Las células eran más anchas que largas, con un rango definido en 1.8-2.6 μm de largo. Finalmente se identificó como *Phormidium terebriforme* [(Agardh ex Gomont) Anagnostidis y Komárek 1988] (Komárek y Anagnostidis, 2005).

Otras dos cepas aisladas del tapete procedente del río Guadarrama mostraron una morfología muy similar (Morfotipo III, Fig. 54, J-L), que también fue observada en algunos tricomas de dicho tapete (Tabla 16). Este morfotipo presentó tricomas de 4 μm de ancho celular, con células constrictas muy marcadas, presencia de necridios y células terminales hemisféricas achatadas intensamente pigmentadas, adyacentes zonas necridiales. De acuerdo a estas características morfológicas se identificó este morfotipo como *Oscillatoria tenuis* (*O. tenuis* 1TGU3 y 4TGU3) [(Agardh ex Gomont) Anagnostidis y Komárek 1988].

En cuanto al tapete que se encontró epifítico en el arroyo Mediano y el tapete epilítico del río Manzanares, mostraron una morfología similar (Morfotipo IV, Fig. 54, M-O) con filamentos verde azulados con vainas de 0.5 μm de grosor, células no constrictas cuyo ancho oscila entre 6-7 μm , y con un contenido celular granular. Por último, las células terminales fueron ligeramente cónicas o redondeadas. Conforme a estas descripciones, se identificaron ambos tapetes como *Phormidium aerugineo-caeruleum* [(Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988] (Komárek & Anagnostidis, 2005).

El último morfotipo encontrado se observó en los tapetes procedentes del arroyo Mediano y del río Guadalix aguas arriba (Morfotipo V, Fig. 54, P-R). Compartieron una morfología muy similar, con filamentos de vaina muy fina, con anchos celulares que variaron en un rango entre 2.8 y 4.2 μm y células no constrictas. Las células apicales aparecieron de forma cónica muy aguda hasta redondeada. Ambos tapetes fueron finalmente identificados como *Phormidium corium* [(Gomont 1892)] (Komárek y Anagnostidis, 2005).

IV.4. Análisis mediante TGGE de la región ARNr 16S.

Con el fin de seleccionar los clones de cada uno de los tapetes procedentes de los distintos ríos para su secuenciación, se realizó un análisis por TGGE (Fig. 56) ya que esta técnica permite discriminar entre distintos genotipos, teniendo en cuenta que distintas alturas de las bandas se corresponden con distintas secuencias. Los resultados obtenidos mostraron una serie de bandas localizadas en la parte inferior del gel que, de acuerdo con el marcador utilizado previamente, es típica en muestras de cianobacterias pertenecientes al orden Oscillatoriales, en concreto, del género *Leptolyngbya* y *Phormidium*.

De los distintos clones obtenidos en el tapete del río Guadarrama, se seleccionaron aquellos representados por una banda con distinta altura (clones 5, 10 y 6) para secuenciar, entre otras que se visualizaron en otros geles distintos (resultados no mostrados). También se pudo observar que las alturas de las bandas procedentes del clon 5 del tapete del río Guadarrama aguas abajo (tapete *Phormidium* GU3) y del aislado *Phormidium* BGU3 se encontraron a una distancia muy próxima entre ellas, además de ubicarse en la parte más inferior del gel con respecto a las demás bandas. Esto parece sugerir que ambas muestras poseen una similitud de identidad génica elevada, como luego se comprobará en el estudio filogenético.

Por otro lado, se pudo obtener información preliminar sobre el número de cepas que componen las distintas muestras naturales de los ríos de estudio, y si se podría encontrar la misma cepa en distintos puntos de muestreo. Según el perfil de bandas, se visualizaron dos clones distintos tanto en el río Manzanares (clon 7 y 1), como en el arroyo Mediano (clon 20 y 28), y que además, dos de ellos parecen ser la misma cepa (clon 7 y clon 28, respectivamente). Estos resultados se corroborarían más adelante en el siguiente apartado.

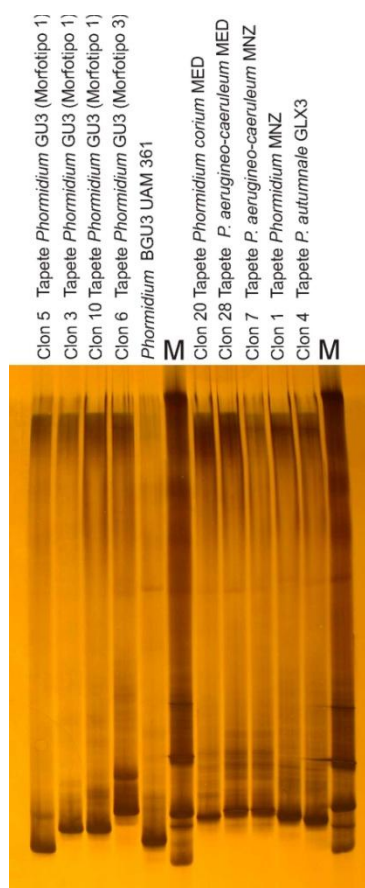


Figura 56. Análisis mediante TGGE de los productos amplificados por PCR del gen ARNr 16S (500 pb) de los distintos clones obtenidos de las muestras naturales recogidas en los puntos de muestreo seleccionados de los ríos Guadarrama (GU3), Guadalix (GLX), Manzanares (MNZ) y arroyo Mediano (MED). M= marcador de referencia.

En cuanto al tapete de *Phormidium* procedente del río Guadalix aguas abajo, se pudo comprobar la existencia de una sola banda (clon 4), y por tanto se esperó una sola cepa dominante en el tapete. La banda más cercana al clon de esta muestra, se corresponde con el clon 1 del tapete del río Manzanares. De igual manera, se podría decir que ambos genotipos poseen una similitud elevada, pero las diferencias se estudiarán a continuación.

IV.5. Caracterización genética y análisis filogenético mediante el empleo del gen ARNr 16S.

Para estudiar las relaciones filogenéticas de las cianobacterias tanto de muestras naturales encontradas (Tabla 16) procedentes de los distintos ríos estudiados como de las cepas aisladas, se determinó la secuencia nucleotídica del gen ARNr 16S (1200 bp).

Con el objetivo de discutir la posición filogenética de estas cianobacterias dentro de la filogenia cianobacteriana, las secuencias de ARNr 16S obtenidos en este estudio se compararon con representantes del mismo género disponibles en la base de datos

(GenBank). Las topologías de los árboles generados por el análisis de parsimonia, de distancia y de máximo likelihood fueron similares, y por eso se representa el árbol filogenético de distancia (NJ, Fig. 57).

El árbol filogenético mostró cinco grupos principales que se correspondieron con los cinco morfotipos principales encontrados. En el **grupo I** se incluyeron nueve secuencias obtenidas en este estudio, así como, varios genotipos obtenidos del GenBank pertenecientes principalmente a cepas de *Phormidium autumnale* y *Microcoleus vaginatus* con un soporte de bootstrap del 98%. El rango de similitud osciló entre el 95.5 y el 100%. Dentro de este grupo se pudieron diferenciar tres subgrupos (Ia, Ib y Ic) con tres genotipos representantes, de acuerdo también con pequeñas diferencias morfológicas encontradas en cada uno (Tabla 16). El **grupo Ia** incluyó las secuencias obtenidas por clonación del tapete del río Guadarrama aguas abajo, así como los dos cultivos aislados *Phormidium* BGU3 y *Phormidium* 2TGU3 del mismo tapete. Con el fin de comparar las secuencias obtenidas en este estudio, se realizó una matriz con los valores de similitud de todas ellas (Tabla 17), las cuales compartieron valores de similitud en un rango del 97.3-98% con el grupo Ib y del 95.9-98.3% con el grupo Ic. El segundo grupo **Ib** contiene secuencias de los clones del tapete encontrado en el río Manzanares, junto con secuencias de tapetes de *Phormidium* encontrados en la Antártida. Una característica a destacar dentro de los grupos **Ia** y **Ib** es la presencia de un inserto de 11 pb dentro del gen ARNr 16S (entre las posiciones 463-468 de *E.coli*). El grupo **Ic** está formado por clones del tapete encontrado aguas abajo en el río Guadalix. La homología encontrada entre estas secuencias y el grupo Ic fue del 97.1-98.1% de similitud, encontrando un valor máximo del 99.1% con la cepa *Phormidium autumnale* VUW18 aislada del río Makarewa, Nueva Zelanda (Heath y col., 2010).

El **grupo II** estaba formado por los cultivos identificados como *Phormidium terebriforme*, junto con clones de la muestra de campo procedente de punto de muestreo del río Guadarrama aguas abajo. Los valores de similitud encontradas entre todas ellas es del 99.9%. Todas ellas están agrupadas con secuencias de las bases de datos identificadas como *P. pseudopristleyi* y *P. cf. terebriformis* con un soporte de grupo elevado (100/99/99).

Figura 57. Árbol filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S (1200 pb) de las muestras naturales de distintos tapetes de *Phormidium* y los cultivos aislados empleados durante este estudio. Este árbol se construyó a partir de los análisis de neighbour-joining (NJ), maximum-likelihood (ML) y maximum-parsimony (MP). Se muestran los valores de bootstrap mayores de 50%. Las secuencias determinadas en este estudio aparecen en negrita. El n° de acceso de las secuencias empleadas para la construcción de este árbol filogenético se indica después del nombre del taxón →

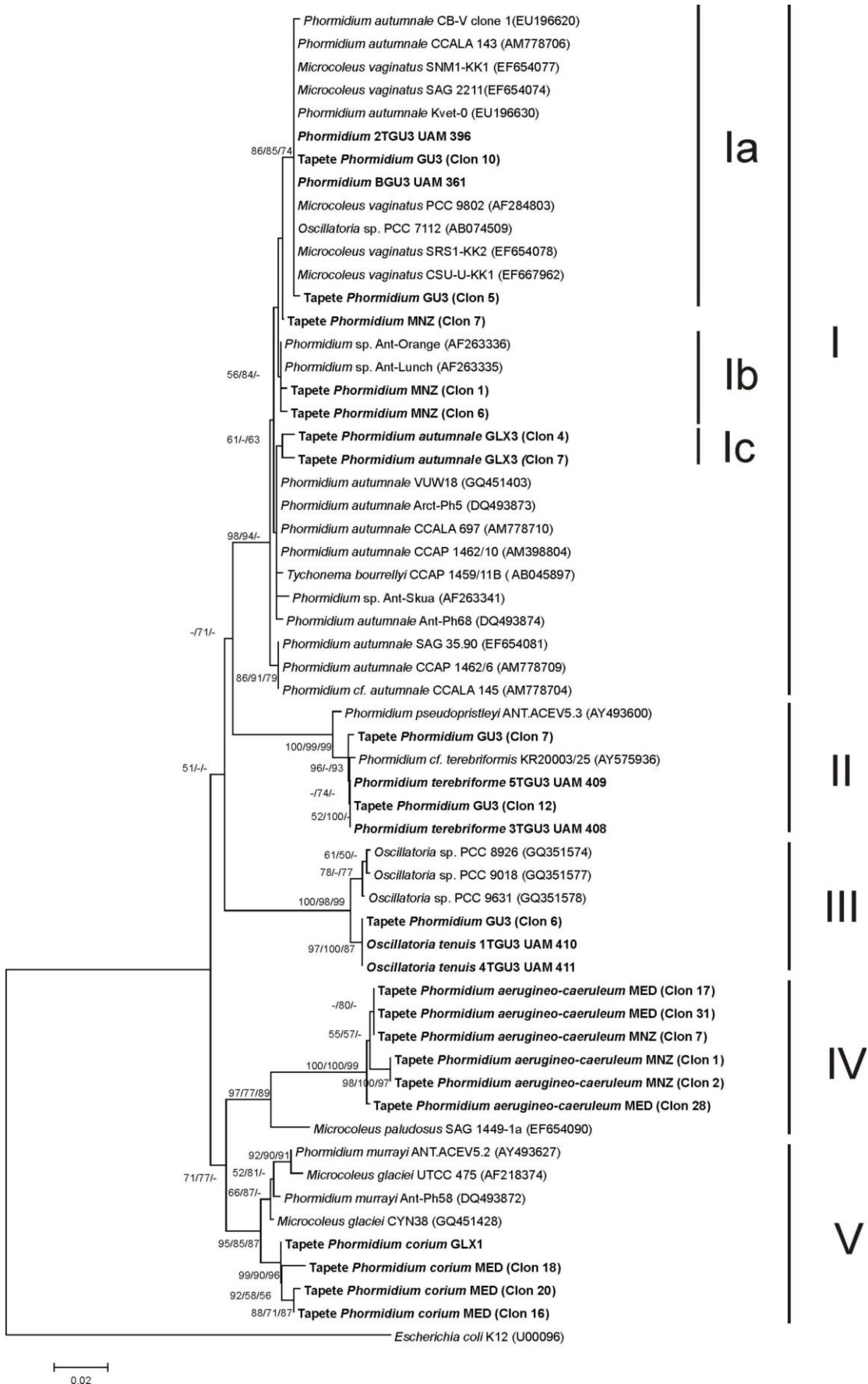


Tabla 17. Matriz del % de similitud generada a partir de aplicar el algoritmo de identidad del servidor EzTaxon (accesible en <http://www.eztaxon.org>) entre las secuencias del gen ARNr 16S de las muestras de *Phormidium* incluidas dentro del grupo I en el árbol filogenético.

Muestra	<i>Phormidium</i> BGU3 UAM 361	<i>Phormidium</i> 2TGU3 UAM 396	Tapete <i>Phormidium</i> GU3 (Clon 5)	Tapete <i>Phormidium</i> GU3 (Clon 10)	Tapete <i>Phormidium</i> MNZ (Clon 1)	Tapete <i>Phormidium</i> MNZ (Clon 6)	Tapete <i>Phormidium</i> MNZ (Clon 7)	Tapete <i>P. autumnale</i> GLX3 (Clon 4)	Tapete <i>P. autumnale</i> GLX3 (Clon 7)
<i>Phormidium</i> BGU3 UAM 361	100								
<i>Phormidium</i> 2TGU3 UAM 396	99.4	100							
Tapete <i>Phormidium</i> GU3 Clon 5	99.2	99.8	100						
Tapete <i>Phormidium</i> GU3 (Clon 10)	98.0	98.6	98.4	100					
Tapete <i>Phormidium</i> MNZ (Clon 1)	98.4	98.7	98.5	97.4	100				
Tapete <i>Phormidium</i> MNZ (Clon 6)	98.3	98.6	98.4	97.3	99.5	100			
Tapete <i>Phormidium</i> MNZ (Clon 7)	98.5	98.7	98.6	97.5	99.5	99.8	100		
Tapete <i>P. autumnale</i> GLX3 (Clon 4)	97.2	97.1	96.9	96.0	97.2	97.1	97.1	100	
Tapete <i>P. autumnale</i> GLX3(Clón 7)	98.1	98.0	97.8	96.7	98.1	98.1	98.1	99.0	100

Las dos cepas aisladas del río Guadarrama identificadas como *Oscillatoria tenuis* 1TGU3 y *O. tenuis* 4TGU3 formaron parte del **grupo III** junto con otras secuencias obtenidas de las bases de datos pertenecientes al género *Oscillatoria* con un soporte de bootstrap muy elevado (100/98/99). Todas ellas mostraron valores de similitud en un rango que osciló entre 98.9 y el 99.3%.

El **grupo IV** altamente soportado (97/77/89), contiene secuencias de clones de los tapetes procedentes del río Manzanares y del río Mediano identificados como el morfotipo *Phormidium aerugineo-caeruleum* con valores de similitud entre el 98.8 y el 99.7%. No se encontraron altas similitudes con secuencias de las bases de datos, la cepa más cercana a este grupo fue *Microcoleus paludosus* SAG 1449-1a con una homología sólo del 93.8%.

Por último, el **grupo V** contiene los clones pertenecientes a los tapetes identificados como *Phormidium corium* del arroyo Mediano y del río Guadalix localizado aguas arriba con valores de similitud del 99.3%. Ambas muestras de campo se agruparon con un soporte elevado (95/85/87) con secuencias de las bases de datos identificadas como *Phormidium murrayi* y *Microcoleus glaciei* (previamente descrito como *P. murrayi*) compartiendo valores de similitud en un rango entre el 97%-98.2%.

IV.6. Características ecológicas.

Al analizar la ecología de los distintos morfotipos y genotipos encontrados, se observó que además se correspondía con diferencias en la calidad de las aguas en las que fueron recogidos los distintos tapetes. Dentro del **morfotipo I**, se pudieron relacionar los tres genotipos distintos hallados Ia, Ib y Ic de acuerdo a las características del punto de muestreo. En el grupo Ia, los representantes del río Guadarrama (clones obtenidos de la muestra natura y las cepas aisladas *Phormidium* BGU3 y *Phormidium* 2TGU3) se localizaron en el sitio de referencia de condiciones designadas como hipertróficas (Tablas 15 y 16). Dentro del subgrupo **Ib**, el tapete *Phormidium* MNZ aparece bajo condiciones mesotróficas, establecidas para el punto de muestreo del río Manzanares. Por último, el tapete recogido en el río Guadalix aguas abajo (grupo **Ic**) fue encontrado bajo condiciones eutróficas.

Igualmente, otros clones procedentes de los tapetes del río Guadarrama, junto con los dos aislados *Oscillatoria tenuis* 1TGU3 y 4TGU3, por una lado, y los aislados

P. terebriforme 3TGU3 y 5TGU3, fueron predominantes también en el punto de muestreo aguas abajo (GU3) del río Guadarrama con condiciones hipertróficas.

Sin embargo, las muestras de campo identificadas como *Phormidium corium* procedentes de los ríos Guadalix (punto GLX1, aguas arriba) y Manzanares, aparecen en condiciones ambientales caracterizadas como oligo-mesotróficas según sus valores de fósforo encontrados. Finalmente, el tapete procedente del arroyo Mediano identificado como *P. aerugieno-caeruleum* está presente en condiciones oligotróficas.

IV.7. Discusión.

En el presente estudio se han encontrado distintos morfotipos de cianobacterias del Orden Oscillatoriales pertenecientes a los géneros *Phormidium* (Kützinger ex Gomot 1892) y *Oscillatoria* (Vaucher ex Gomont 1892). *Phormidium* se considera taxonómicamente como uno de los géneros más problemáticos (Komárek y Anagnostidis, 2005), donde las especies descritas dentro de este grupo comprenden numerosos morfotipos con diversas formas de transición, además de una diversidad genética inherente a dicho género (Baker y col., 2001; Marquardt y Palinska, 2007).

Un aspecto de gran importancia que hemos encontrado es el estudio del estado trófico de las aguas donde fueron encontrados los distintos tapetes de *Phormidium* y *Oscillatoria* analizados. Las cianobacterias, como se ha comentado anteriormente, son organismos que también se encuentran presentes en una gran variedad de ecosistemas acuáticos. Su gran distribución ecológica refleja una gran variedad de especies con diferentes características (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993). Dentro de esa distribución cosmopolita, ciertas cianobacterias tienen unas ciertas exigencias ecológicas que determinan que su presencia, ausencia o abundancia puedan reflejar las características del agua. En este sentido, en el presente estudio se han encontrado distintos morfotipos relacionados con distintos genotipos en ríos con calidades de agua variadas.

Así, basándonos en los resultados del análisis filogenético del gen ARNr 16S, se encontraron diversos genotipos agrupados dentro del árbol filogenético en cinco grupos principales que se correspondieron a su vez con los distintos morfotipos descritos previamente, junto con sus características ecológicas. En el grupo I, constituido mayoritariamente por cepas de las bases de datos identificadas como *Phormidium autumnale*, fue posible distinguir tres subgrupos claros que se correspondían con tres

genotipos distintos, en relación también a distintas características morfológicas y ecológicas de cada uno de ellos.

A nivel morfológico, se encontraron diferencias dentro del grupo I. A pesar de compartir los caracteres morfológicos básicos (ancho celular 5-8 μm , presencia de caliptra y vaina), las diferencias en el ancho celular son pequeñas en comparación con previos estudios donde se encontraron rangos entre 0.7-6.3 μm (Palinska y Marquardt, 2008), donde dichas medidas pueden variar no sólo entre cepas sino también dentro de cada una. Dichas variaciones podrían ser debidas a las diferencias en la disposición de nutrientes o luz en el medio (Komárek, 1972; Prézelin y col. 1987; Cermeno y col. 2006). Las diferencias más destacadas en el grupo I se observaron en los estudios realizados con microscopía electrónica de transmisión (TEM) con el objetivo de estudiar principalmente la disposición de los tilacoides. Según Komárek y Anagnostidis (2005), el género *Phormidium* se caracteriza por tener los tilacoides orientados de manera radial, pero desafortunadamente, esta característica no se ha demostrado en la mayoría de las especies descritas tanto en muestras naturales como en cultivo. Según los resultados obtenidos en las tres muestras analizadas, la disposición de los tilacoides no se corresponden con los descritos para los miembros del género *Phormidium*, excepto para el aislado *Phormidium* sp. BGU3. Además, se pudieron diferenciar dos tipologías distintas las cuales, a nivel genético, también están separadas. Las cepas aisladas y aquellas secuencias de las bases de datos con estudios morfológicos realizados a nivel ultraestructural (Lokmer, 2007; Palinska y Marquardt, 2008) que conforman el grupo filogenético **Ia**, mostraron una orientación de los tilacoides en paralelo al eje longitudinal. Por el contrario, el tapete perteneciente al grupo **Ic** junto con otras secuencias procedentes de las bases de datos cercanas (con valores de similitud entre 97.5 y 98.1%) (Marquardt y Palinska, 2007; Palinska y Marquardt, 2008), todas ellas muestran una orientación irregular formando pequeñas agrupaciones. Por lo tanto, se encontró congruencia entre los resultados inferidos del análisis genético entre las muestras estudiadas y la disposición de sus tilacoides, aportando más información al respecto, de igual manera observado en otros estudios previos (Casamatta y col., 2005).

El grupo **Ia** lo componen también secuencias pertenecientes al género *Oscillatoria* y cepas de *Microcoleus vaginatus* de la base de datos. Estos resultados son congruentes con otros estudios realizados por otros autores (Marquardt y Palinska, 2007; Comte y col., 2007; Palinska y Marquardt, 2008; Heath y col., 2010) basados en

la descripción de varias cepas de *Phormidium* procedentes de diversos orígenes geográficos. A pesar de que este subgrupo está genéticamente asociado en su mayoría a cepas del género *Microcoleus*, estudios previos han comentado que cultivos de cianobacterias procedentes de este grupo genotípico están morfológicamente más asociadas al género *Oscillatoria* (Izaguirre y col., 2007; Fleming y Prufert-Bebout, 2010).

El subgrupo **Ib** está representado por secuencias de *Phormidium* con similitudes de identidad ligeramente más bajas y con diferencias en el ancho de sus tricomas con respecto al subgrupo anterior. Sin embargo el subgrupo **Ic**, compuesto por las secuencias correspondientes al tapete *Phormidium* del río Guadalix encontrado aguas abajo, y parece que este genotipo muestra pequeñas diferencias con un ancho de tricoma más fino. Otra característica genética a destacar dentro de los grupos **Ia** y **Ib**, es la presencia de un inserto de 11 pb en la zona variable 6 (V6) en el gen ARNr 16S, el cual ya ha sido previamente descrito en cepas de *Microcoleus vaginatus* (Garcia-Pichel y col., 2001; Baker y col., 2001), así como en otras cepas del género *Phormidium* encontradas en la Antártida (Nadeau y col., 2001; Casamatta y col., 2003; Taton y col., 2006a; Strunecký y col., 2010) y en aguas dulces europeas (Rudi y col., 1998; Lokmer, 2007).

Como ya se apuntaba en el capítulo I, los estudios de homología ADN-ADN se han empleado para medir el grado de relaciones entre los organismos con una similitud alta en la secuencia de ARNr 16S. Los organismos con más de un 70% de homología en el ADN, el cual es el valor límite para el reconocimiento de una especie (Wayne y col., 1987), comparten normalmente más del 97% de similitud del gen ARNr 16S (Stackebrandt & Goebel, 1994). Así, se propuso que cuando las cepas tenían menos del 97.5% de similitud, los datos de la secuencia proporcionaban una fuerte evidencia de que las cepas son especies separadas. Posteriormente, Stackebrandt y Ebers (2006) establecieron este punto en ≥ 98.7 -99% para considerar miembros de la misma especie. En el presente estudio el grupo I presentó un rango de similitud de 95.9-100%, lo que nos está indicando que dentro de este grupo están incluidas especies distintas. De acuerdo con el límite de homología de secuencias establecido, y teniendo en cuenta los valores de similitud de identidades de los subgrupos Ia, Ib y Ic, (Tabla 17), se podría concluir que los distintos subgrupos se corresponden con especies diferentes.

Otro aspecto a tener en cuenta es el hecho de que todas las secuencias incluidas en dicho grupo I, pertenecen a cepas aisladas de una mezcla de diferentes hábitats

(terrestre, desiertos, regiones polares y aguas dulces) y ha sido descrito en distintos estudios como el grupo *Phormidium autumnale*, a pesar de que ya se habían encontrado diferencias tanto a nivel morfológico como genético (Comte y col., 2007; Heath y col., 2010; Strunecky y col., 2010). En el presente estudio, se observó que las diferencias morfológicas encontradas en las muestras estudiadas, coinciden con los resultados filogenéticos, en los cuales existe una separación de las cepas en subgrupos con alto valor de soporte. Además, los distintos subgrupos tuvieron una distribución diferencial apareciendo los representantes del grupo **Ia** en aguas hipertróficas, los del grupo **Ib** en aguas mesotróficas y el grupo **Ic** en aguas eutróficas.

El **morfotipo-genotipo II** identificado como *Phormidium terebriforme* (morfotipo encontrado en el río Guadarrama aguas abajo y dos aislados a partir del mismo tapete) presentó valores de similitud del 99% con secuencias de las bases de datos procedentes de otros estudios que se corresponden con *P. terebriforme* y *P. pseudopristleyi* (Ballot y col., 2004; Taton y col., 2006b). Este grupo difiere del grupo principal *P. autumnale* principalmente por presentar tricomas estrechos, células terminales curvadas en forma de garfio y la ausencia de caliptra. De acuerdo con Komárek y Anagnostidis (2005) las especies pertenecientes a este taxon son muy variables y morfotipos muy similares podrían pertenecer a distintos genotipos.

El **morfotipo-genotipo III** clasificado como *Oscillatoria tenuis* (correspondiente al tapete del río Guadarrama aguas abajo y dos aislados procedentes del mismo tapete) difiere del resto por poseer tricomas muy rectos, con claras constricciones celulares, presencia de necridios y células terminales hemiesféricas. En el análisis filogenético, las dos cepas de estudio se agruparon con un soporte del 100% junto con otras cepas de *Oscillatoria* de las bases de datos. Tanto el morfotipo **II** como el **III**, fueron representantes del punto de referencia aguas abajo en el río Guadarrama con características hipertróficas. *P. terebriforme* ha sido descrito previamente como indicadores potenciales de aguas contaminadas de carácter orgánico (Kolkwitz y Marsson, 1908 y revisiones (Fjerdingsstad, 1964; Sládeček, 1973; Rott y col., 1997) y *O. tenuis* (junto con otras especies de *Phormidium*) está recogida como especie de aguas eutróficas según un nuevo índice basado en algas bentónicas para evaluar el estado trófico de los ríos nórdicos (Schneider y Lindstrøm, 2011).

Las muestras de campo pertenecientes al morfotipo identificado como *Phormidium aerugineo-caeruleum* (**genotipo IV**) se caracterizaron por presentar largos

filamentos con una vaina prominente y un contenido celular granulado. Son cianobacterias bentónicas típicas de aguas de gran corriente. De acuerdo con los resultados filogenéticos, las secuencias con mayor similitud encontradas en las bases de datos fue la correspondiente a *Microcoleus paludosus*. La distinta morfología observada junto con los valores de porcentaje de similitud obtenidos entre ellas (menor del 95%), sugieren que ambas pertenecen a géneros distintos. A nivel ecológico, esta especie procedente tanto del arroyo Mediano como del río Manzanares, está presente en condiciones oligo-mesotróficas.

El último morfotipo (**genotipo V**) identificado como *Phormidium corium* se agrupó con cepas pertenecientes a *Phormidium murrayi* y *Microcoleus glaciei*. Estos resultados coinciden con anteriores investigaciones (Casamatta y col., 2005; Taton y col., 2006a; Comte y col., 2007; Heath y col., 2010) en las cuales se muestran que varias cepas de *Phormidium* se agruparon con *P. murrayi*. Actualmente, la clasificación de *P. murrayi* está en revisión, y se sugiere que dicho taxón debería agruparse con el género *Microcoleus* y no con *Phormidium* (Casamatta y col., 2005; Comte y col., 2007). De acuerdo con Comte y colaboradores (2007) y Heath y colaboradores (2010), los valores elevados de similitud encontrados en las muestras de este estudio con aquellas pertenecientes a *Microcoleus* debería ser clarificada. Cabe destacar que la taxonomía en cianobacterias es complicada y puede generar asignaciones genéricas o específicas inapropiadas a la hora de la identificación de dichos organismos, y en consecuencia, implica que muchas de las secuencias obtenidas de las bases de datos estén mal clasificadas (Komárek, 2010). Además, otra información de gran importancia es que ambos tapetes procedentes de los ríos Guadalix aguas arriba y Manzanares, aparecen en condiciones ambientales caracterizadas como oligo-mesotróficas según sus valores de fósforo encontrados. Tanto el morfotipo *P. aerugineo-caeruleum* como *P. corium* se han descrito previamente como especies cuya presencia es típica de aguas pobres en nutrientes, en mayor proporción en esta última (Rott y col., 1997; Branco y Pereira, 2002; Perona y Mateo, 2006).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los distintos morfotipos fueron separados tanto a nivel morfológico y genético, permitiendo diferenciar a su vez distintos ecotipos, incluso a nivel de subgrupo (dentro del grupo I). En definitiva, la caracterización ecológica de cada una de las muestras estudiadas puede contribuir a la taxonomía de las mismas, como un rasgo identificativo añadido que servirá de referencia para futuros estudios y para su posible aplicación en estudios de

biomonitorización de la calidad de las aguas en ríos. En conclusión, cabe resaltar la necesidad de estudios polifásicos para llevar a cabo la caracterización de cepas de *Phormidium* procedentes de distintas condiciones ambientales y también enfatizar en la falta de datos disponibles en las bases de datos para llevar a acabo futuras investigaciones sobre uno de los géneros de cianobacterias más controvertidos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La estructura y composición de las comunidades de cianobacterias en el tramo del río Guadarrama estudiado, varió en función del gradiente de eutrofización encontrado aguas abajo. La calidad del agua de los tres puntos elegidos en dicho río fue diferente, presentando el punto GU1 aguas oligo-mesotróficas y los puntos GU2 y GU3 aguas hipertróficas. Se encontraron diferencias en las cianobacterias observadas en los distintos puntos de muestreo, con una reducción de la diversidad aguas abajo, y se pudieron distinguir tres grupos de especies en función de su tolerancia a la contaminación. Se encontraron especies características de aguas con bajo contenido en nutrientes, especies tolerantes a eutrofización y especies características de aguas con elevadas concentraciones de nutrientes.
2. En los bioensayos de competencia en sustrato artificial, las especies *Phormidium* sp. y *S. elongatus* dominaron en un medio rico en nutrientes. Mientras que *T. penicillata* y *N. carneum* fueron las que predominaron en un medio pobre. Las especies *L. boryana*, *L. nostocorum*, y *Pseudanabaena catenata* crecieron indistintamente en ambos medios sin presentar una dominancia clara, excepto, las especies *Aphanocapsa muscicola* y *Pleurocapsa minor* que crecieron en mayor proporción en medios ricos y pobres en nutrientes, respectivamente.
3. En los bioensayos bajo un gradiente de nutrientes, en monocultivo, se observaron dos tipos de comportamiento. Las cianobacterias *Phormidium* sp. y *L. boryana* presentaron un mayor crecimiento a altas concentraciones de nitrato y amonio, aunque en menor medida esta última. Con respecto al fosfato, el crecimiento de ambas aumentó según aumentaba éste, hasta llegar a una concentración límite (10 mg/l) por encima de la cual se inhibió el crecimiento. Sin embargo, las especies *T. penicillata* y *N. carneum* tuvieron un mayor crecimiento a bajas concentraciones de todos los nutrientes analizados. En los bioensayos de competencia frente al gradiente de concentración de nutrientes,

Phormidium sp. y *L. boryana* dominaron a altas concentraciones y al contrario, *T. penicillata* y *N. carneum* dominaron a bajas concentraciones.

4. Mediante la técnica molecular TGGE (utilizando como marcador molecular el ARNr 16s), se observaron diferencias en los perfiles genéticos (patrones de bandas) entre los puntos de muestreo en relación con las diferencias encontradas en el estado trófico de las aguas. Así, se encontró una disminución de la diversidad de las comunidades de cianobacterias aguas abajo, correlacionadas con un incremento en la carga de nutrientes, en relación con la ausencia de especies sensibles que fueron desplazadas en las localidades más contaminadas por genotipos más competitivos.
5. Mediante el análisis filogenético de las secuencias obtenidas de las bandas de TGGE, se pudieron distinguir distintos grupos de genotipos en relación también con la carga de nutrientes de los distintos puntos de muestreo. Se encontraron genotipos (relativos a los géneros *Chamaesiphom* y *Phormidium*) que mostraron variaciones en la respuesta a variables ambientales como el caudal, la concentración de nutrientes (NID, PRS) y conductividad, así como a las variaciones en el oxígeno disuelto. Además, los análisis moleculares de “fingerprinting” o huella genética nos han permitido detectar una mayor diversidad que la observada en los análisis morfológicos, mostrando la mayoría de los morfotipos más abundantes de las muestras naturales procedentes del epilíton.
6. Los cambios tanto en la estructura como en la composición de las comunidades de cianobacterias se reflejaron en las diferencias encontradas en los perfiles genéticos, así como la diferenciación de genotipos según sus exigencias ecológicas. En concreto, el punto aguas arriba (GU1) presentó una comunidad de cianobacterias con un gran número de individuos pertenecientes al orden Chroococcales, mientras que por el contrario, en los puntos situados aguas abajo (GU2 y GU3) y en mayor proporción en el GU3, se observaron una mayor abundancia de cianobacterias pertenecientes al orden Oscillatoriales.

7. De acuerdo con los datos abundancia de campo junto con los bioensayos bajo un gradiente de nutrientes y los obtenidos mediante la técnica TGGE, podemos describir especies potencialmente bioindicadoras de la calidad del agua en el río Guadarrama. Se define a *T. penicillata* y *N. carneum* como especies bioindicadoras de aguas con bajo contenido en nutrientes como también *Chamaesiphon* sp., *Leptolyngbya tenuis*, *L. nostocorum* y *Pleurocapsa minor*. Al contrario, *Phormidium* sp. y *Synechococcus elongatus* características de aguas eutróficas. *L. boryana* y *Pseudanabaena catenata* crecen tanto en aguas limpias, como contaminadas, aunque la primera presenta un mayor crecimiento en estas últimas.
8. El análisis polifásico de muestras naturales y cepas aisladas de distintos ríos pertenecientes a los géneros *Phormidium* y *Oscillatoria*, permitió distinguir diferentes genotipos que se correspondieron con los distintos morfotipos encontrados tanto en microscopía óptica como electrónica. A su vez, éstos se relacionaron con las diferencias en el estado trófico de las aguas, pudiéndose definir distintos ecotipos. Así, las cepas *Phormidium* BGU3, *Phormidium* 2TGU3, *P. terebriforme* y *O. tenuis* se catalogaron como especies de aguas hipertróficas; *P. autumnale* GLX3 de aguas eutróficas y, tanto *P. aerugineo-caeruleum* y *P. corium*, se describieron como especies de aguas oligomesotróficas.
9. Las diferencias observadas en los estudios morfológicos entre las cepas y muestras naturales se correspondieron con las obtenidas en los estudios genéticos, por lo que queda evidente la complementariedad de ambos tipos de estudios. De este modo, el empleo de los estudios polifásicos, que han integrado información, fenotípica, genotípica, y ecológica, tanto en los estudios taxonómicos como en los análisis de comunidades de cianobacterias, han resultado ser una herramienta valiosa en la identificación y caracterización de las cianobacterias en relación con la calidad de las aguas.
10. Los resultados obtenidos del análisis de la comunidad epilítica de cianobacterias utilizando la técnica de TGGE revelan la validez de la misma, al mostrar diferencias claras en la diversidad entre los distintos puntos de muestreo que se

correspondieron con el estado trófico de los mismos. Esta técnica puede complementar las técnicas clásicas utilizadas en los estudios de biomonitorización de la calidad del agua en ríos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboal, M. (1988).** Aportación al conocimiento de las algas epicontinentales del Sudeste de España. III: Cianofíceas (*Cyanophyceae* Schaffner 1909). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **45**: 3-46.
- Aboal, M. (1989).** Epilithic algal communities from River Segura Basin, Southeastern Spain. *Arch Hydrobiol* **116**:113-124.
- Aboal, M. y Puig, M. A. (2009).** Microcystin production in *Rivularia* colonies of calcareous streams from Mediterranean Spanish basins. *Algol Stud* **130**:39-52.
- Aboal, M., Puig, M. A., Mateo, P. y Perona, E. (2002).** Implications of cyanophyte toxicity on biological monitoring of calcareous streams in north-east Spain. *J Appl Phycol* **14**, 49-56.
- Aboal, M., Puig, M. A. y Asencio, A. D. (2005).** Production of microcystins in calcareous Mediterranean streams: Alharabe River, Segura River basin in south-east Spain. *J Appl Phycol* **17**, 231-243.
- Ahlgren, G. y Hyenstrand, P. (2003).** Nitrogen limitation effects of different nitrogen sources on nutritional quality of two freshwater organisms, *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) and *Synechococcus* sp. (Cyanophyceae). *J Phycol* **39**: 906-917.
- Ahmed, M., Stal, L. J. y Hasnain, S. (2010a).** Association of non-heterocystous cyanobacteria with crop plants. *Plant Soil* **336**:363–375.
- Ahmed, M., Stal, L. J. y Hasnain, S. (2010b).** DTAF: an efficient probe to study cyanobacterial-plant interaction using confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**(1):249-255.
- Alba-Tercedor J. y Sánchez-Ortega A. (1988).** Un método simple para evaluar la calidad biológica de las aguas corrientes basado en el de Hellawell (1978). *Limnetica* **4**:51-56.
- Alba-Tercedor, J., Jáimez-Cuellar, P., Álvarez, M., Avilés, J., Bonada, N., Casas, J., Mellado, A., Ortega, M., Pardo, I., Prat, N., Rieradevall, M., Robles, S., Sáinz-Cantero, C. E., Sánchez-Ortega, A., Suárez, M.L., Toro, M., Vidalabarca, M.R., Vivas, S. y Zamora-Muñoz, C. (2002).** Caracterización del estado ecológico de ríos mediterráneos ibéricos mediante el índice IBMWP (antes BMWP). *Limnetica* **21**(3-4): 175-185.
- Albertano, P y Kováčik, L. (1994).** Is the genus *Leptolyngbya* (Cyanophyte) a homogeneous taxon? *Arch Hydrobiol/Algolog Stud* **75**:37-51.
- Aline, T (2008).** Dissolution of dead corals by euendolithic microorganisms across the northern Great Barrier Reef (Australia). *Microb Ecol* **55**:569–580.
- Allen, M. M. y Arnon, D. I. (1955).** Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiol* **30**, 366.
- Allen, M. M. y Smith, A. J. (1969).** Nitrogen chlorosis in the blue-green algae. *Arch Microbiol* **69**, 11-120.
- Álvarez-Cobelas, M. y Gallardo, T. (1988).** Catálogo de las algas continentales españolas V. *Cyanophyceae* Schaffner 1909. *Acta Botanica Malacitana* **13**: 53-76.
- Álvarez-Cobelas, M., Rubio, A., Muñoz, P. (1992).** Eutrophication in Spanish freshwater ecosystems. *Limnética* **8**, 263-266.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215** (3), 403-10.
- Amann, R. I., Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.
- Anagnostidis K. y Komarek J. (1985).** Modern approach to the classification system of cyanophytes, Introduction. *Arch Hydrobiol Suppl, Algol Stud* **38/39**:291–302.

- Anagnostidis K. y Komarek J. (1988).** Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Arch Hydrobiol Algol Stud* **50–53**:327–472.
- Anagnostidis, K. y Komárek, J. (1990).** Modern approach to the classification-system of cyanophytes .5. Stigonematales. *Archiv Hydrobiol Suppl. 86 Algological Studies* **59**, 1-73.
- Anderson-Glenna, M. J., Bakkestuen, V. y Clipson, N. J. W. (2008).** Spatial and temporal variability in epilithic biofilm bacterial communities along an upland river gradient. *FEMS Microbiol Ecol* **64**: 407–418.
- Antón, A. I., Martínez-Murcia, A. J. y Rodríguez-Valera, F. (1998).** Sequence diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. *J Mol Evol* **47**, 62–72.
- A.P.H.A. (1980).** Standart Methods for the examination of water and wastewater. APHA. AWWA-WPCF. Washington.
- Ariño Ortiz, G. y Sastre Beceiro, M. (1999).** *Leyes de Aguas y Política Hidráulica en España (Los mercados regulados del agua)*. Editorial Comares, S.L. Granada, España: P-p. 345.
- Ariosa, Y, Quesada, A., Aburto, J., Carrasco, D., Carreres, R., Leganés, F. y Fernández Valiente, E. (2004).** Epiphytic cyanobacteria on *Chara vulgaris* are the main contributors to N₂ fixation in rice fields. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5391-5397.
- Ascaso, C y Rapsch, S. (1985).** Chloroplast-ultrastructure and chlorophyll content in leaves from *Quercus* branches with and without epiphytic lichen thalli. *Plant Cell Environ* **8** (9): 651-656.
- Asencio, A.D. & Aboal, M. (2000).** Algae from La Serreta cave (Murcia, SE Spain) and their environmental conditions. *Algol Stud* **96**: 59-78.
- Ashelford, K. E. (2006).** New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol* **72** (9), 5734-5741. Distribuido por los autores en <http://www.cardiff.ac.uk/biosi/research/biosoft/>.
- Badger, M. R. y Price, G. D. (1990).** Carbon oxysulfide is an inhibitor of both CO₂ and HCO₃⁻ uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Physiol* **94**, 35-39.
- Baker, P. D. (1991).** *Identification of common noxious Cyanobacteria. Part I-Nostocales*. Urban Water Res. Assoc. Aust. Res. Rep. 29. 132 pags.
- Baker, P. D. (1992).** *Identification of common noxious Cyanobacteria. Part II-Chroococcales and Oscillatoriales*. Urban Water Res. Assoc. Aust. Res. Rep. 46. 139 pags.
- Baker, P. D., Stevensen, D. A., Humpage, A. R., Nicholson, B. C, Falconer, I. R., Lanthois, B., Fergusson, K. M. y Saint, C. P. (2001).** Preliminary evidence of toxicity associated with the bentic cyanobacterium *Phormidium* in South Australia. *Environ Toxicol* **16**:506–511.
- Ballot, A., Dadheech, P. K. y Krienitz, L. (2004).** Phylogenetic relationship of *Arthrospira*, *Phormidium* and *Spirulina* strains. *Arch Hydrobiol/Algolog Stud (Cyanobact. Res. 5)* **113**:37-56.
- Banerjee, M., Everroad, R., y Castenholz, R. (2009).** An unusual cyanobacterium from saline thermal waters with relatives from unexpected habitats. *Extremophiles* **13** (4):707-716.
- Bano, N. y Hollibaugh, J. T (2000).** Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of beta subdivision of the class *Proteobacteria* in the Arctic Ocean *Appl Environ Microbiol* **66**:1960-1969.
- Barker, G. L. A., Handley, B. A., Vacharapiyasophon, P., Stevens, J. R. y Hayes, P. K. (2000a).** Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (cyanobacteria) filaments in the Baltic Sea. *Microbiology* **146**, 2865-2875.

- Barker, G. L. A., Konopka, A., Handley, B. A. y Hayes, P. K. (2000b).** Genetic variation in *Aphanizomenon* (Cyanobacteria) colonies from the Baltic Sea and North America. *J Phycol* **36**, 947-950.
- Bates, S.T., Nash III, T. H., Sweat, K. G y Garcia-Pichel, F. (2010).** Fungal communities of lichen-dominated biological soil crusts: Diversity, relative microbial biomass, and their relationship to disturbance and crust cover. *J Arid Environ* **74**: 1192-1199.
- Becker, S., Boger, P., Oehlmann, R. y Ernst, A. (2000).** PCR bias in ecological analysis: A case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **66**:4945-4953.
- Beier, S., Witzel, K. P. y Marxsen, J. (2008).** Bacterial community composition in Central European running waters examined by temperature gradient gel electrophoresis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **74**(1): 188-199.
- Benito, G., Puig, M. A. (1999).** El BMWPC, índice adaptado a las características de los ríos catalanes. *Tecnología del Agua* **191** :43-56.
- Berrendero, E., Perona, E. y Mateo, P. (2008).** Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 447-460.
- Berrendero, E., Perona, E. y Mateo, P. (2011).** Phenotypic variability and phylogenetic relationships of *Tolypothrix* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *Int J Syst Evol Microbiol* En prensa (on-line:<http://ijsb.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/ijs.0.027581-0v1> (doi:ijs.0.027581-0)).
- Bertani, G. (1951).** Studies on lysogenesis. 1. The mode of phage liberation by lisogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62** (3), 293-300.
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A.-K., Hochedlinger, G., Hödl, I., Baranyi, C., Battin, T. J. (2007).** Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl Environ Microbiol* **73** (15): 4966-4974.
- Biggs, B. J. F. y Smith, R. A. (2002).** Taxonomic richness of stream benthic algae: effects of flood disturbance and nutrients. *Limnol Oceanogr* **47** (40): 1175-1186.
- Blomqvist, P., Pettersson, A. y Hyenstrand, P. (1994).** Ammonium-nitrogen: A key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems. *Arch Hydrobiol* **132** (2): 141-164.
- Boone, D. N. y Castenholz, R. W. (1989).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 3 (Eds.) Springer-Verlag, New York.
- Boone, D. N. y Castenholz, R. W. (2001).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 1 (Eds.) Springer-Verlag, New York.
- Borja, A., Miles, A., Occhipinti-Ambrogi, A. y Berg, T. (2009).** Current status of macroinvertebrate methods used for assessing the quality of European marine waters: implementing the Water Framework Directive. *Hydrobiol* **633**(1):181-96.
- Borneman J. y Triplett E. W. (1997).** Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2647-2653.
- Bornet, E. y Flahault, C. (1886-1888).** Revision des Nostocaceas heterocystés. *Ann Sci Nat Bot.* **7**, ser, 3: 323-381, 4: 343-373, 5: 51-129, 7: 171-262.
- Bourrelly, P. (1970a).** Les algues d'eau douce, vol. III, 512 págs. N. Boubée & Cie., Paris.
- Bourrelly, P. (1970b).** Note sur la famille des Oscillatoriacées-Schweiz. *Z. Hydrol* **32**, 519-522.
- Bourrelly, P. (1985).** Les algues d'eau douce, vol. III-2ed, 606 págs. N. Boubée & Cie., París.

- Boutte, C., Komárkova, J., Grubisic, S., Znachor, P., Bataille, A., Zapomělová, E., Gullukaya, A., Jezberová, J. y Wilmotte, A. (2005). A poliphasic approach to assess the cyanobacterial diversity of summer samples from Czech reservoirs. *Arch Hydrobiol Suppl* **117**: 177-195.
- Boutte, C., Grubisic, S., Balthasart, P. y Wilmotte, A. (2006). Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *J Microbiol Methods* **65**:542-550.
- Boyer, S. L., Flechtner, V. R. y Johansen, J. R. (2001). Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Mol Biol Evol* **18**, 1057-1069.
- Boyer, S. L., Johansen, J. R., Flechtner, V. R. y Howard, G. L. (2002). Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S–23S ITS region. *J Phycol* **38**, 1222–1235.
- Branco, L. H. Z., Pereira, J. L. (2002). Evaluation of seasonal dynamics and bioindication potential of macroalgal communities in a polluted tropical stream. *Arch Hydrobiol* **155**, 147–161.
- Brinkmann, M., Pearce, D. A., Convey, P. y Ott, S. (2007). The cyanobacterial community of polygon soils at an inland Antarctic nunatak. *Polar Biol* **30**:1505–1511.
- Brown, I. I., Bryant, D. A., Casamatta, D., Thomas-Keprta, K. L., Sarkisova, S. A., Shen, G., Graham, J. E., Boyd, E. S., Peters, J. W., Garrison, D. H. y McKay, D. S. (2010). Polyphasic characterization of a thermotolerant siderophilic filamentous cyanobacterium that produces intracellular iron deposits. *Appl Environ Microbiol* **76** (19): 6664-72.
- Brümmer, I. H. M., Felske, A. y Wagner-Döbler, I. (2003). Diversity and seasonal variability of β -Proteobacteria in biofilms of polluted rivers: Analysis by Temperature Gradient Gel Electrophoresis and cloning. *Appl Environ Microbiol* **69** (8): 4463–4473.
- Caar, N. G. y Whitton, B. A. (1982). *The biology of Cyanobacteria*. Univ. of California Press, Berkeley y Los Angeles, pp 688.
- Camacho, A. y de Wit, R. (2003). Effect of nitrogen and phosphorus additions on a benthic microbial mat from a hypersaline lake. *Aqu Microb Ecol* **32**: 261-273.
- Camacho, A., Wurtsbaugh, W.A., Miracle, M. R., Armengol, X y Vicente, E. (2003). Nitrogen limitation of phytoplankton in a Spanish karst lake with a deep chlorophyll maximum: a nutrient enrichment bioassay approach. *J Plank Res* **25**(4):397-404.
- Campbell, S.E. (1983). The modern distribution and geological history of calcium carbonate boring microorganisms. En: *Bio mineralization and Biological metal accumulation*. (Eds. P. Westbroek y P. de Jong), Reidel Publishing, Boston, págs. 99– 104.
- Cantonati, M. (1996). Ecology of cyanophytes in mountain springs of the River Sarca catchment (Adamello-Brenta Regional Park, Trentino, Northern Italy). *Algol Stud* **83**: 145-162
- Cardemil, L. y Wolk, L. P. (1981). Isolated heterocysts of *Anabaena variabilis* synthesize envelope polysaccharide. *Biochem Biophys Acta* **671**, 265-276.
- Carmona, J., Perona, E., Sánchez-Díaz, E. y Loza, V. (2011). Morphological and ecological characterization of Batrachospermales (Rhodophyta) in the Jarama Basin, Iberian Peninsula. *Limnetica* **30**(1): 117-128.
- Carrasco, D., Moreno, E., Sánchis, D., Wormer, L., Paniagua, T., Del Cueto, A. y Quesada, A. (2006). Cyanobacterial abundante and microcystin occurrence in Mediterranean water reservoirs in Central Spain: microcystins in the Madrid area. *Eur J Phycol* **41** (3), 281-291.

- Carrasco, D., Moreno, E., Paniagua, T., de Hoyos, C., Wormer, L., Sanchis, D., Cires, S., Martín del Pozo, D., Codd, Geoffrey A. y Quesada, A. (2007).** Anatoxin-a occurrence and potential cyanobacterial anatoxin-a producers in Spanish reservoirs. *J Phycol* **43**(6):1120-1125.
- Casamatta, D. A., Vis, M. L. y Sheath, R. G. (2003).** Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. *Aquatic Bot* **77**, 295-309.
- Casamatta, D. A., Johansen, J. R., Vis, M. L. y Broadwater, S. T. (2005).** Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the *Oscillatoriales* (cyanobacteria). *J Phycol* **41**:421-438.
- Casamayor, E., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedrós-Alió, C y Muyzer, G. (2000).** Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: Comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **66**(2):499-508.
- Casamayor, E. O., Pedros-Alio, C., Muyzer, G. y Amann, R. (2002).** Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Appl Environ Microbiol* **68**(4):1706-1714.
- Castenholz, R. W. (1989).** General characteristics of the cyanobacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 3, págs. 582-585. (Eds. D. R. Boone y R. W. Castenholz) Springer, New York.
- Castenholz, R. W. (2001).** General characteristics of the Cyanobacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Eds. E. Garrity, D.R. Booner y R.W. Castenholz), Springer, New York, vol. 1, págs. 474-487.
- Catalán, J. (1990).** Química del agua (2ªedición). Ed. Bellisco. Madrid. 413 págs.
- Cermeno P, Maranon E, Harbour D, Harris RP (2006).** Invariant scaling of phytoplankton abundance and cell size in contrasting marine environments. *Ecol Lett* **9**, 1210–1215.
- Chacón, E., Berrendero, E. y Garcia-Pichel, F. (2006).** Biogeological signatures of microboring cyanobacterial communities in marine carbonates from Cabo Rojo, Puerto Rico. *Sed Geol* **185**, 215–228.
- Cho J-C. y Tiedje, M. (2002).** Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* **68**(3):1425-1430.
- Choi, A., Kim, S-G., Yoon, B-D. y Oh, H-M. (2003).** Growth and amino acid contents of *Spirulina platensis* with different nitrogen sources. *Biotech Bio Engin* **8**, 368-372.
- Chu, S. P. (1942).** The influence of the mineral composition of the media on the growth of planktonic algae. 1. Methods and culture media. *J Ecol* **30**, 284-325.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K. y Lim, Y.W. (2007).** EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2259–2261.
- Cohen-Bazire, G. y Bryant, D. A. (1982).** Phycobilisomes: composition and structure. En: *The Biology of Cyanobacteria*. Vol. 19, págs. 143-191. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Comisión Europea (2000).** Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Boletín de la UE, 2000 (L327/1).
- Compère, P. (2005).** The nomenclature of the Cyanophyta under the Botanical Code. *Arch Hydrobiol. Algol Stud* **117**, 31-37.

- Comte, K., Sabacká, M., Carré-Mlouka, A., Elster, J & Komárek, J. (2007). Relationships between the Arctic and Antarctic cyanobacteria; three *Phormidium*-like strains evaluated by a polyphasic approach. *FEMS Microbiol Ecol* **59**:366-376.
- Costa, J. L., Paulsrud, P. y Lindblad, P. (2002). The cyanobacterial tRNA(Leu) (UAA) intron: evolutionary patterns in a genetic marker. *Mol Biol Evol* **19**, 850-857.
- Cuzman, O. A., Ventura, S., Sili, C., Mascalchi, C., Turchetti, T., D'Acqui, L. P. y Tiano, P. (2010). Biodiversity of phototrophic biofilms dwelling on monumental fountains. *Microb Ecol* **60** (1):81-95.
- Dasey, M., Ryan, N., Wilson, J., McGregor, G., Fabbro, L., Neilan, B. A., Burns, B. P., Kankaanpää, H., Morrison, L. F., Codd, G. A., Rissik, D. y Bouling, L. (2005). Investigations into the taxonomy, toxicity accumulations in the Myall lake, Australia. *Mar Freshwater Res* **56**, 45-55
- Desikachary, T. V. (1959). Cyanophyta. *Indian Council of Agricultural Research. New Delhi*. 686 págs.
- Díez, B., Pedrós-Alió C., Marsh, T. L., y Massana R. (2001). Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2942-2951.
- Díez, B., Bauer, K. y Bergman, B. (2007). Epilithic cyanobacterial communities of a marine tropical beach rock (Heron Island, Great Barrier Reef): diversity and diazotrophy. *Appl Environ Microbiol* **73**(11):3656-3668.
- Dorador, C., Vila, I., Imhoff, J. F y Witzel, K. P. (2008). Cyanobacterial diversity in Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile: an example of geographical dispersion? *FEMS Microbiol Ecol* **64**: 419-432.
- Dorigo, U., Voltier, L., Humbert, J.F. (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic communities. *Water Res* **39**: 2207-2218.
- Douterelo, I., Perona, E., Mateo, P. (2004). Use of cyanobacteria to assess water quality in running waters. *Environ Pollution* **127** (3), 377-384.
- Drews, G. y Weckesser, J. (1982). Function, structure and composition of cell walls and external layers. Vol. 19, págs 333-357. En: *The Biology of Cyanobacteria* (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton). *Blackwell Scientific Publications*, Oxford.
- Drouet, F. (1968). Revision of the classification of the Oscillatoriaceae. *Acad Nat Sci Philadelphia*, Monogr 15, págs 370.
- Drouet, F. (1981). Summary of the classification of the blue-green algae. *Bei N Hedwigia* **66**, 133-209.
- Ducobu, H., Huisman, J., Jonker, R. R. y Mur, L. R. (1998). Competition between a prochlorophyte and a cyanobacterium under various phosphorus regimes: comparison with the droop model. *J Phycol* **34**: 467-476.
- Dvornyk, V. y Nevo, E. (2003). Genetic polymorphism of cyanobacteria under permanent natural stress: a lesson from the "Evolution Canyons". *Res Microbiol* **154**, 79-84.
- Dyble, J., Paerl, H. W. y Neilan, B. A. (2002). Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA*-IGS nucleotide sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2567-2571.
- Economou-Amilli, A., Anagnostidis, K. y Roussomoustakaki, M. (1984). Structural aspects of the adaptation of some blue-green algae and diatoms to desiccation. En: *Being alive on lands*. Págs. 103-114 (Eds. N. S. Margaris, M. Arianoutsou-Faraggitaki y W. C. Oechel). *The Hague-Boston-Lancaster*.

Eichner, C. A., Erb, R. W., Timmis, K. N. y Wagner-Dobler, I. (1999). Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl Environ Microbiol* **65**, 102-109.

Elenkin, A. A. (1936-1949). Monographia algarum Cyanophycearum aquidulcium et terrestrium in finibus URSS inventarum. *I et II., Izd.Akad. Nauk SSSR, Moskva-Leningrad.* **I**: 684pags, **II**: 1908 pags.

Elser, J. J., Marzolf, E. R. y Goldman, C. R. (1990). Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in the freshwaters of North America: a review and critique of experimental enrichments. *Can J Fish Aquat Sci* **47**: 1468–1477.

Elser, J. J., Bracken, M. E. S., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., Ngai, J. T., Seabloom, E. W., Shurin, J. B. y Smith, J. E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* **10**: 1135–1142.

Elvebakk, A., Papaefthimiou, D., Robertsen, E. H. y Liaimer, A. (2008). Phylogenetic patterns among Nostoc cyanobionts within Bi- and tripartite lichens of the genus *Pannaria*. *J Phycol* **44**(4):1049-1059.

Ernst, A., Marschall, P y Postius, C. (1995). Genetic diversity among *Synechococcus* spp (Cyanobacteria) isolated from the pelagial of Lake Constance. *FEMS Microbiol Ecol* **17**(3):197-203.

Ernst, A., Becker, S., Wollenzien, U. I. A. y Postius, C. (2003). Ecosystem-dependent adaptative radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequences analysis. *Microbiol* **149**:217-228.

Ernst, A., Deicher, M., Herman, P. M. J. y Wollenzien, U. I. A. (2005). Nitrate and phosphate affect cultivability of cyanobacteria from environments with low nutrient levels. *Appl Environ Microbiol* **71**(6): 3379–3383.

Fay, P. (1983). *The Blue-greens* (Cyanophyta-Cyanobacteria). The Institute of Biology's Studies in Biology nº 160. (Ed. E. Arnold) Ltd. London.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.

Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., y Akkermans, A. D. (1998). Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse a grassland soils (The Netherlands). *Appl Environ Microbiol* **64**: 871-879.

Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Mateo, P. y Bonilla, I. (1991). Blue-green algae (cyanobacteria) as indicators of water quality in two Spanish rivers. En: *Use of Algae for Monitoring Rivers* (Eds. B.A. Whitton, E. Rott y G. Friedrich). Institut für Notanik Universität. Innsbruck, Austria. págs. 151-156.

Fernández-Valiente, E., Camacho, A., Rochera, C., Rico, E., Warwick, F. V. y Quesada, A. (2007). Community structure and physiological characterization of microbial mats in Byers Peninsula, Livingston Island (South Shetland Islands, Antarctica) *FEMS Microbiol Ecol* **59**, 377–385.

Fernández-Valiente, E., Leganes, F., Fernández Piñas, F. y Quesada, A. (2010). Fijación de nitrógeno en cianobacterias. En: *Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las Interacciones Beneficiosas Planta-Microorganismo*. Ed. M. Mejías, R. Rivilla, M.J. Soto, M. J. Delgado, E. González, P. Mateos y M. León. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN) Granada 2010. En prensa.

Ferrari, V. C., y Hollibaugh, J. T. (1999). Distribution of microbial assemblages in the Central Arctic Ocean basin studied by PCR/DGGE: analysis of a large data set. *Hydrobiol* **401**:55–68.

Ferris, M. J., G. Muyzer y Ward D. M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol* **62**:340–346.

- Fewer, D., Friedl, T. y Büdel, B. (2002).** *Chroococcidiopsis* and heterocyst-differentiating cyanobacteria are each other's closest living relatives. *Mol Phylogenet Evol* **23** (1), 82-90.
- Fjordingstad, E. (1964).** Pollution of streams estimated by benthic phytomicro-organisms. I. A saprobic system based on communities of organism and ecological factors. *Int Rev Ges. Hydrobiol* **49**, 63–131.
- Figueiredo, D. R., Pereira, M. J., Moura, A., Silva, L., Bárrios, S., Fonseca, F., Henriques, I. y Correia, A. (2007).** Bacterial community composition over a dry Winter in meso-and eutrophic Portuguese water bodies. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 638-650.
- Fleming, E. D., y Prufert-Bebout L. (2010).** Characterization of cyanobacterial communities from high-elevation lakes in the Bolivian Andes. *J Geophys Res* **115**, G00D07, doi:10.1029/2008JG000817.
- Flores, E. y Herrero, A. (1994).** Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation, págs. 487-517. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. (Ed. D. A. Bryant) *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands.
- Frank, H., Lefort, M. y Martin, H. H. (1962).** Chemical analysis of mucopolymer component in cell walls of the blue-green alga *Phormidium uncinatum*. *Biochem Biophys Res Commun* **7**, 322-325.
- Franken, R. J. M., Waluto, B., Peeters, E. T. H. M., Gardeniers, J. J. P., Beijer, J. A. J., Scheffer. (2005).** Growth of shredders on leaf litter biofilms: the effect of light intensity. *Fresh Biol* **50**: 459–466.
- Friedman, E. I. (1980).** Endolithic microbial life in hot and cold deserts. *Orig Life Evol Biosph* **10** (3), 223-235.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M. y Rossi, P. (2002).** Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol* **4**(11):634-643.
- Fujimoto, N. y Sudo, R. (1997).** Nutrient-limited growth of *Microcystis aeruginosa* and *Phormidium tenue* and competition under various N : P supply ratios and temperatures. *Limnol Oceanogr* **42**(2): 250-256.
- Furtado, A. L. F., Calijuri, M. C., Lorenzi, A. S., Honda, R. Y., Genuario, D. B., Fiore, M.F. (2009).** Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiol* **627**, 195–209.
- Gaedke, U., y Weisse T. (1998).** Seasonal and interannual variability of picocyanobacteria in Lake Constance (1987–1997). *Arch Hydrobiol Spec Issues Adv Limnol* **53**:143–158.
- Gantt, E. (1994).** Supramolecular membrane organization. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Págs 119-138. (Ed. A. Bryant). *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands.
- García-Pichel (2006).** Plausible mechanisms for the boring on carbonates by microbial phototrophs. *Sed Geol* **185**, 205–213.
- Garcia-Pichel, F. y Castenholz, R. W. (1991)** Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J Phycol* **27**, 395–409.
- Garcia-Pichel, F., Lopez-Cortes, A. & Nübel, U. (2001).** Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1902–1910.
- García-Pichel, F., Johnson, S. L., Youngkin, D. y Belnap, J. (2003).** Small-scale vertical distribution of bacterial biomass and diversity in biological soil crusts from arid lands in the Colorado Plateau. *Microb Ecol* **46**, 312–321.
- Garcia-Pichel, F., Ramirez-Reinat, E. y Gao, Q. (2010).** Microbial excavation of solid carbonates powered by P-type ATPase-mediated transcellular Ca²⁺ transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 21749-21754.

- Gast, R. J., Dennett, M. R. y Caron, D. A. (2004).** Characterization of protistan assemblages in the Ross Sea, Antarctica, by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **70**(4), 2028 -2037.
- Geitler, L. (1932).** Cyanophyceae. En: *Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, vol. 14. (Eds. L. Rabenhorst) Leipzig: *Akademische Verlagsgesellschaft*. 1196 págs.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J. y Pace, N. R. (1988).** Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J Bacteriol* **170**, 3584-3592.
- Gkelis, S., Rajaniemi, E., Vardaka, M., Moustaka-Gouni, M., Lanaras, T. & Sivonen, K. (2005).** *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (Cyanobacteria) strains from lake Kastoria, Greece from a separate phylogenetic group. *MicrobEcol* **49**, 176-182.
- Golubic, S., Friedmann, I. E., Schneider, J. (1981).** The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. *J Sediment Petrol* **51**, 475-478.
- Golubic, S., Campbell, S., Drobne, K., Cameron, B., Balsman, W. L., Cimmerman, F., Dubois, L. (1984).** Microbial endoliths: a benthic overprint in the sedimentary record, and a paleobathymetric crossreference with foraminifera. *J Paleontol.* **58**, 351- 361.
- Gómez, N., Donato, J. C., Giorgi, A., Guasch, H., Mateo, P. y Sabater, S. (2009).** La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos. Págs: 219-242. En: *Conceptos y técnicas en ecología fluvial* (Eds. A. Eloregi y S .Sabater) con la Fundación BBVA. Editorial Rubes, España.
- Gomont, M. (1892).** Monographie des Oscillatoriées (Nostocacées homocystées). *Ann Sci Nat Bot* **15**, 263-368, **16**, 91-264. Cramer, Germany.
- Greuter, W., McNeill, J., Barbie, F. R., Burdet, H. M., Demoulin, V., Filgueiras, T. S., Nicolson, D. H., Silva, P. C., Skog, J. E., Trehae, P., Turland, N. J. y Hawksworth, D. L. (2000).** International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code) adopted by the Sixteenth International Botanical Congress St. Louis, Missouri, July-August 1999. Koeltz Scientific Books, Königstein. (Regnum Vegetabile 138), XVIII, págs. 474.
- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G. y Collier, J. L. (1994).** The responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Págs 641-675. (Ed. A. Bryant) *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands.
- Grossman, J. M. , O'Neill B. E., Tsai S. M., Liang B. Q., Neves E., Lehmann J. , Thies J. E. (2010).** Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. *Microb Ecol* **60**,192-205.
- Guerrero, M. G. y Lara, C. (1987).** Assimilation of organic nitrogen. En: *The Cianobacteria*. Págs. 163-186. (Eds. P. Fay y C. Van Baalen). *Elsevier Science Publisher*, Oxford.
- Gugger, M., Lyra, C., Henriksen, P., Coute, A., Humbert, J. F. y Sivonen, K. (2002a).** Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1867-1880.
- Gugger, M., Lyra, C., Suominen, I., Tsitko, I., Humbert, J. F., Salkinoja-Salonen, M. S. y Sivonen, K. (2002b).** Cellular fatty acids as chemotaxonomic markers of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Planktothrix* (Cyanobacteria). *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1007-1015.
- Gugger, M. y Hoffman, L. (2004).** Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 349-357.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Ecol* **166** (4), 557-580.
- Hartig, J., Trautrim, C., Dolan, D.M., Rathke, D.E. (1990).** The rationale for Ohio's detergent phosphorous ban. *Water Res Bull* **23**: 867-871.

- Haslam, S. M. (1978).** River Plants: the macrophytic vegetation of watercourses. Cambridge University Press. Cambridge. 396 pages.
- Hayes, P. K. (1988).** Gas vesicles: Chemical and physical properties. En: *Methods in Enzimology*. Vol. 167. *Cyanobacteria*, págs 213-221. (Eds. L. Packer y A. N. Glazer). *Academic Press*, Inc, New York.
- Hayes, P. K., Barker, G. L. A., Batley, J., Beard, S. J., Handley, B. A., Vacharapiyasophon, P. y Walsby, A. E. (2002).** Genetic diversity within populations of cyanobacteria assessed by analysis of single filaments. *Ant Lee Int J Gen Mol Microbiol* **81**, 197-202.
- Healey, F. P. (1973).** Characteristics of phosphorous deficiency in *Anabaena*. *J Phycol* **9**, 383-394.
- Healey, F. P. (1982)** Phosphate. En: *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, págs. 105-124. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton) *Blackwell Scientific Publisher*, Oxford.
- Heath M. W., Wood, S. A., Ryan, K. G. (2010).** Polyphasic assessment of fresh-water benthic mat-forming cyanobacteria isolated from New Zealand. *FEMS Microbiol Ecol* **73**: 95-109.
- Hennig, C. y Hausdorf, B. (2004).** Distance-based parametric bootstrap tests for clustering of species ranges. *Comput Stat Data An* **45**, 875-896.
- Hense, I. y Beckmann, A. (2006).** Towards a model of cyanobacteria life cycle: effects of growing and resting stages on bloom formation of N₂-fixing species. *Ecol Model* **195**, 205-218.
- Henson, B. J., Watson, L. E. y Barnum, S. R. (2002).** Molecular differentiation of the heterocystous cyanobacteria, *Nostoc* and *Anabaena*, based on complete *nifD* sequences. *Curr Microbiol* **45**, 161-164.
- Herdman, M. (1982).** Evolution and genetic properties of cyanobacterial genomes. En: N.G. Carr y B.A. Whitton (Eds). *The biology of cyanobacteria*. Blackwell Sci. Public., Oxford, pp: 263-305.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. y Wellington, E. M. H. (1997).** Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* **63**(8), 3233-3241.
- Hoffmann, L. (1988a).** Algae of terrestrial habitats. *Bot Rev* **55**, 77-105.
- Hoffmann, L. (1988b).** Criteria for the classification of the blue-green algae (cyanobacteria) at the genus and at the species level. *Arch Hydrobiol Supl.* **80**, 1-4 *Algol Stud* **50/53**, 131-139.
- Hoffman, L., Komárek, J. y Kaštovský, J. (2005).** System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria)-state in 2004. *Algol Stud* **117**, 95-115.
- Hrouzek, P., Šimek, M. y Komárek, J. (2003).** Nitrogenase activity (acetylene reduction activity) and diversity of six soil *Nostoc* strains. *Arch Hydrobiol Suppl* **146**, 87-101.
- Hu, N. T., Thiel, T., Giddings, T. M. y Wolk, C. P. (1982).** *Anabaena* and *Nostoc* cyanophages from sewage settings ponds. *Virol* **114**: 236-246.
- Hyenstrand, P; Blomqvist, P; Petersson, A. (1998).** Factors determining cyanobacterial success in aquatic systems - a literature review. *Arch Hydrobiol Spec Issues Advanc Limnol* **51**: 41-62.
- Ishida, T., Watanabe, M. M., Sugiyama, J. y Yokota, A. (2001).** Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Let.* **201**, 79-82.
- Iteman, I., Rippka, R., De Marsac, N. T. y Herdman, M. (2000).** Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology* **146**, 1275-1286.

- Izaguirre, G., Jungblut, A.D. & Neilan, B.A. (2007).** Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. *Water Res* **41**: 492-498
- Janse, I., Bok, J. y Zwart, G. (2004).** A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Met* **57**, 279-281.
- Janson, S. y Granéli, E. (2002).** Phylogenetic analyses of nitrogen-fixing cyanobacteria from the Baltic Sea reveal sequence anomalies in the phycocyanin operon. *Int J Syst Evo Microbiol* **52**, 1397-1404.
- Kaebernick, M. y Neilan, B. A. (2001).** Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 1-9.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, T., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M y Tabata, S. (1996).** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein.coding regions. *DNA Res* **3**, 109-136.
- Kelly, M. G., Whitton, B. A., (1998).** Biological monitoring of eutrophication in rivers. *Hydrobiol* **384**, 5-67.
- Kelly, M., S. Juggins, R. Guthrie, S. Pritchard, J. Jamieson, B. Rippey, Hirst H., y Yallop M., (2008).** Assessment of ecological status in U.K. rivers using diatoms. *Fresh Biol* **53**(2), 403-422.
- Keswani, J. y Whitman, W. B. (2001).** Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 667-678.
- Kisand, V. y Wikner, J. (2003).** Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *J Microbiol Methods* **54**:183-191.
- Klug, J.L. (2006).** Nutrient limitation in the lower Housatonic River Estuary. *Estuar Coasts* **29**(5): 831-840.
- Kneip, C., Lockhart, P., Voß, C y Maier, U. G. (2007).** Nitrogen fixation in eukaryotes - New models for symbiosis. *BMC Evol Biol* **7**: 1471-2148.
- Knoll, A. H. (1985).** The distribution and evolution of microbial life in the late Proterozoic era. *Annu Rev Microbiol* **39**, 391-417.
- Kolkwitz, R. y Marsson, M. (1908).** Ökologie der pflanzliche Saprobien. *Ber Dt Botan Ges* **26**, 505-519.
- Komárek J. (1972).** Temperaturbedingte morphologische Variabilität bei drei *Phormidium*-Arten (Cyanophyceae) in Kulturen. *Preslia* **44**:293-307.
- Komárek, J. (2003).** Planktic oscillatoriacean cyanoprokaryotes (short review according to combined phenotype and molecular aspects). *Hydrobiol* **502**, 367-382.
- Komárek, J. (2010).** Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiol* **639**, 245-259.
- Komárek, J. y Anagnostidis, K. (1989).** Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 Nostocales. *Arch Hydrobiol Suppl* **82**, 3 *Algological Studies* **36**, 247-345.
- Komárek, J. y Anagnostidis, K. (1999).** Cyanoprokariota: Chroococcales. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 1ª edición vol. 19/1 (Ed. G. Fischer), Jena Stuttgart Lübeck Ulm, Germany. Págs. 545.

- Komárek, J. y Anagnostidis, K. (2005).** Cyanoprokariota: Oscillatoriales. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 1ª edición vol. 19/2 (Eds. B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner y M. Schagerl), Elsevier, München, págs. 759
- Komárek J. y Čáslavská J. (1991).** Thylakoidal patterns in oscillatorialean genera. - *Arch Hydrobiol/Algolog Stud* **64**, 267-270.
- Komárek, J. y Kaštovský, J. (2003).** Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Arch Hydrobiol* **148**, 4 *Algological Studies* **109**, 305-325.
- Kruskopf, M y Du Plessis, S. (2006).** Growth and filament length of the bloom forming *Oscillatoria simplicissima* (Oscillatoriales, Cyanophyta) in varying N and P concentrations. *Hydrobiol* **556**:357–362.
- Laamanen, M. J., Forsstrom, L. y Sivonen, K. (2002).** Diversity of *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacterium) populations along a Baltic Sea salinity gradient. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5296-5303.
- Lachance, M. A. (1981).** Genetic relatedness of heterocystous cyanobacteria by acid-deoxyribonucleic acid reassociation. *Int J Syst Bacteriol* **31**, 139-147.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. y Pace, N. R. (1985).** Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 6955-6959.
- Lapage, S. P., Sneath, P. H. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R. y Clark, W. A. (1992).** International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). Bacteriological Code. Washington, DC: *American Society for Microbiology*.
- Ledreux, A., Thomazeau, S., Catherine, A., Duval, C., Yepremian, C., Marie, A. y Bernard, C. (2010).** Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. *Harmful Algae* **10** (1):88-97.
- Leganés, F., Carreres, R., González Tomé, R., Nieva, M., Quesada, A., Sendra, J. y Fernández Valiente, E. (2001).** Effect of phosphate fertilisation, straw incorporation, insecticide application and inoculation with cyanobacteria on rice productivity. *Rev Invest Agr: Prod Prot Veg* **16**: 273-282.
- Legendre, P y Legendre, L (1998).** *Numerical Ecology*. 2ª ed. Ámsterdam: Elsevier Science.
- Leira, M. y Sabater, S. (2005).** Diatom assemblages distribution in catalán rivers, NE Spain, in relation to chemical and physiological factors. *Water Res* **39**, 73-82.
- Lemke, M. J., Lienau, E. K., Rothe, J., Pagioro, T.A., Rosenfeld, J. y DeSalle, R. (2009).** Description of freshwater bacterial assemblages from the Upper Paraná River floodpulse system, Brazil. *Microb Ecol* **57**: 94–103.
- Lepère, C., Wilmotte, A. y Meyer, B. (2000).** Molecular diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Syst Geogr Plants* **70**, 275–283.
- Lidnström, E. A., y Traaen, T. S. (1984).** Influence of current velocity on periphyton distribution and succession in a Norwegian soft water river. *Ver Int Verein Lim* **22**:1965-1972.
- Ligon, P. J. B., Meyer, K. G., Martin, J. A. y Curtis, S. E. (1991).** Nucleotide sequence of a 16S rRNA gene from *Anabaena* sp. strain PCC7120. *Nucleic Acids Res* **19**, 4553.
- Lockhart, PJ, Steel, MA, Hendy, MD y Penny, D. (1994).** Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution. *Mol Biol Evol*, **11**, 605– 602. 602.
- Lokmer, A. (2007).** Master Thesis. Polyphasic approach to the taxonomy of the selected oscillatorian strains (Cyanobacteria). Director: Dr. Jan Kaštovský. Department of Botany. Faculty of Biological Sciences. University of South Bohemia.

- López-Cortés, A., García-Pichel, F., Nübel, U. y Vázquez-Juarez, R. (2001).** Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, México: a polyphasic study. *Int Microbiol* **4** (4), 227-36.
- Lovett, J., Schmidt, M., Lovett, L. (1994).** Biological, assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors. *Biol Rev* **69**: 147-186.
- Lowe, R. L. (1979).** Ecological factors controlling stream phytobentos in regulated stream. En: *The Ecology of Regulated Rivers* (Eds. J.V. Ward y J.A. Stanford) Plenum Press. New York. Pag.: 25-34.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleither, M. y Schleifer, K. H. (1998).** Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**, 554-568.
- Lundgren, P., Carpenter, E. J. y Bergman, B. (2001).** Katagnymene: Characterization of a novel marine diazotroph. *J Phycol* **37**, 1052-1062.
- Lyatey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J. L. y Garabetian, F. (2005).** Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rRNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprintings interpretation. *Water Res* **39**, 380-388.
- Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundman, P., Paulin, L. y Sivonen, K. (2001).** Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 513-526.
- Lyra, C., Laamanen, M., Lehtimäki, J. M., Surakka, A. y Sivonen, K. (2005).** Benthic cyanobacteria of the genus *Nodularia* are non-toxic, without gas vacuolas, able to glide and genetically more diverse than planktonic *Nodularia*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 555-568.
- Maestre, F.T, Martín, N., Díez, B., López-Poma, R., Santos, F., Luque, I. y Cortina, J. (2006).** Watering, fertilization, and slurry inoculation promote recovery of biological crust function in degraded soils. *Microb Ecol* **52**: 365-377.
- Makino, F. I. y Tsuzaki, J. (1971).** Absence of histone in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Nature* **231**, 446-447.
- Malik, S., Beer, M., Mallavarapu, M. y Naidu, R. (2008).** The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ Int* **34**:265-276.
- Mandel, M. y Higa, A. (1970).** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53** (1), 159- 162.
- Marcarelli, A. M y Wurtsbaugh, W. A. (2006).** Temperature and nutrient supply interact to control nitrogen fixation in oligotrophic streams: An experimental examination. *Limnol Oceanogr* **51**(5):2278-2289.
- Marco, E. y Orús, M.I. (1988).** Variation in growth and metabolism with phosphorus nutrition in two cyanobacteria. *J Plant Physiol* **132**: 339-344.
- Margalef, R. (1952).** *Materiales para una flora de las algas del NE. de España*, IVa, *Cyanophyceae*. *Collectánea Botánica* **3** (10): 209-229.
- Margalef, R. (1953).** *Materiales para una flora de las algas del NE. de España*, IVb, *Cyanophyceae*. *Collectánea Botánica* **3** (20): 231-260.
- Margalef, R. (1983)** *Limnología*. Ed. Omega. Barcelona. 1010 págs.
- Margheri, M. C., Piccardi, R., Ventura, S., Viti, C. y Giovannetti, L. (2003).** Genotypic diversity of oscillatoriacean strains belonging to the genera *Geitlerinema* and *Spirulina* determined by 16S rDNA restriction analysis. *Curr Opin Microbiol* **46**, 359-364.

- Marquardt, J. y Palinska, K. A. (2007).** Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Arch Microbiol*, **187**, 397–413.
- Mateo, P., Douterelo, I., Berrendero, E. y Perona, E. (2006).** Physiological differences between two species of cyanobacteria in relation to phosphorus limitation. *J Phycol* **42**, 61–66.
- Mateo, P., Berrendero, E., Perona, E., Loza, V. y Whitton, B. A. (2010).** Phosphatase activities of cyanobacteria as indicators of nutrient status in a Pyrenees river. *Hydrobiol* **652**, 255–268.
- Mateo, P., Perona, E., Berrendero, E., Leganés, F., Martín, M y Golubić, S. (2011).** Life cycle as a stable trait in the evaluation of diversity of *Nostoc* from biofilms in rivers. *FEMS Microbiol Ecol* doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01040.x.
- McCormick, P. V. y Stevenson, R. J., (1991).** Mechanisms of periphyton succession in lotic environments. *Ecology* **72**, 1835–1848.
- McGregor, G., y J. Rasmussen. (2008).** Cyanobacterial composition of microbial mats from an Australian thermal spring: a polyphasic evaluation. *FEMS Microbiol Ecol* **63**, 23–35.
- McMahon, K. D., Gu, A. Z., Nerenberg, R. y Sturm B. M. (2008).** Molecular Methods in Biological Systems. *Water Environ Res* **80**: 929–961.
- McQueen, J. B. (1967).** Some methods for classification and Analysis of Multivariate Observations. Proceedings of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability. Berkeley, University of California Press, 1:281–297.
- Miller, A. G., Espie, G. S. y Canvin, D. T. (1990).** Physiological aspects of CO₂ and HCO₃⁻ transport by cyanobacteria: a review. *Can J Bot* **68**, 1291–1302.
- Ministerio de Medio Ambiente. Confederación Hidrográfica del Tajo (1999).** *La cuenca del Tajo en cifras*. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid. 119 pags.
- Mitrovic, S. M., Bowling, L. C. y Buckney, R. T. (2001).** Responses of Phytoplankton to *in-situ* nutrient enrichment; potential influences on species dominance in a river. *Int Rev Hydrobiol* **3**, 285–298.
- Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S. Y Arai, T. (1986).** Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* **323**, 720–722.
- Miura, S y Yokota, A. (2006).** Isolation and characterization of cyanobacteria from lichen. *J Gen Appl Microbiol* **52**:365–374.
- Morales, A. (2010).** Estudio de poblaciones de cianobacterias en el río Guadalix (Madrid) y su utilización en biomonitorización. Proyecto fin de carrera de la Licenciatura de Biología. Universidad Autónoma de Madrid.
- Muyzer G. (1999).** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **2**:317–322.
- Muyzer, G., y K. Smalla. (1998).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Leeuwenhoek *Int J Gen Microbiol* **73**:127–141.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. y Uitterlinden, A. G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695–700.

- Myers, R. M., Fischer, S. G., Maniatis, T. y Lerman, L. S. (1985).** Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA-sequence as determined by denaturing gradient gel-electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **13** (9), 3111-3129.
- Nadeau T. L., Milbrandt E. C. y Castenholtz R. W. (2001).** Evolutionary relationships of cultivated Antarctic Oscillatorians (Cyanobacteria). *J Phycol* **37**, 650–654.
- Neal, C., Jarvie, H.P., Withers, P.J.A., Whitton, B.A. y Neal, M. (2010).** The strategic significance of wastewater sources to pollutant phosphorus levels in English rivers and to environmental management for rural, agricultural and urban catchments. *Sci Tot Environ* **408**: 1485-1500.
- Necchi O. Jr., Ribeiro Dip M., Maira Goés R. (1991).** Macroalgae of a stream in south eastern Brazil: composition, seasonal variation and relation to physical and chemical variables. *Hydrobiol* **213**: 241-250.
- Nelissen, B., De Baere, R., Wilmotte, A y De Wachter, R. (1996).** Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. *J Mol Evol* **42**:194-200.
- Nichols, J. M. y Adams, D. G. (1982).** Akinetes. En: *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, págs. 387-412. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton) *Blackwell Scientific Publishers*, Oxford.
- Nicholas, K. B. y Nicholas, H. B. L. (1997).** GeneDoc: a tool for editing and annotation multiple sequence alignments. Distribuido por los autores en <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Nikolausz, M., Sipos, R., Révész, S., Székely, A. y Márialigeti, K. (2005).** Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiol Lett* **244**:385-390.
- Nogueroles-Seoane, A. y Rifón-Lastra, A. (1999).** *Aphanocapsa muscicola* (Meneghini) Wille, *Gloeocapsa decorticans* (A. Braun) P. Richter, *Chroococcus coharens* (Brébisson) Nägeli y *Chroococcidiopsis doonensis* R.B. Sing (Chroococcales, Cyanophyta), nuevas referencias para el N.O. de la Península Ibérica. *Nova Acta Ci. Compostelana (Biol.)* **9**: 5-9. (C, Lu, Or, Po, AEP, Cyanophyceae).
- Nollau, P. y Wagnener, C. (1997).** Methods for detection of point mutations: Performance and quality assessment. *Clin Chem* **43** (7), 1114-1128.
- Norris, T. B., Mcdermott, T. R. y Castenholz, R. W. (2002).** The long-term effects of UV exclusion on the microbial composition and photosynthetic competence of bacteria in hot-spring microbial mats. *FEMS Microbiol Ecol* **39** (3), 193-209.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., y Muyzer, G. (1997).** PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* **63** (8), 3327-32.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Clavero, E. y Muyzer, G. (2000).** Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ Microbiol* **2** (2):217 -226.
- Odum, E. P. (1972).** *Ecología*. Ed. Interamericana. 639 pags.
- Oksanen, I., Jokela, J., Fewer, D. P., Wahlsten, M., Rikkinen, J. y Sivonen, K. (2004).** Discovery of rare and highly toxic microcystins from lichen-associated cyanobacterium *Nostoc* sp strain IO-102-I. *Appl Environ Microbiol* **70**(10):5756-5763.
- Olapade, O. A. y Leff, L. G. (2004).** Seasonal dynamics of bacterial assemblages in epilithic biofilms in a northeastern Ohio stream. *J N Am Benthol Soc* **23** (4): 686–700.
- Oliver R. L. y Ganf G. G. (2000).** Freshwater blooms. In: Whitton BA, Potts M, eds. *The ecology of Cyanobacteria*, 149-194.

- Olsson-Francis, K., de la Torre, R. y Cockell, C. S. (2010).** Isolation of novel extreme-tolerant cyanobacteria from a rock-dwelling microbial community by using exposure to low earth orbit. *Appl Environ Microbiol* **76** (7), 2115–2121.
- Organization for Economic Cooperation and Development (1982).** *Eutrophication of Waters: Monitoring, Assessment, and Control*. OECD, Paris.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. y Hayashi, K. (1989).** Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain-reaction. *Genomics* **5**, 874-879.
- Orús, M. I., Rodríguez-Buey, M. L., Martínez, F. y Marco, E. (1995).** Biogénesis and ultraestructure of carboxysomes from wild type and mutans of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Plant Physiol* **107**, 1159-1166.
- O'Sullivan, L. A., Weightman, A. J. y Fry, J. C. (2002).** New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon. *Appl Environ Microbiol* **68**(1), 201–210.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Matsumoto, S. y Watanabe, M. M. (2000)** Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *J Gen Appl Microbiol* **46**, 39-50.
- Ou, M. M., Y. Wang y W. M. Cai, (2005)** Physiological and biochemical changes in *Microcystis aeruginosa* Qutz. in phosphorus limitation. *J Integr Plant Biol* **47**, 692–702.
- Padilla, C., Sanz-Alfárez, S., del Campo, FF. (2006).** Toxin characterisation and identification of a *Microcystis flos-aquae* strain from a Spanish drinking-water reservoir. *Arch Hydrobiol* **165** (3), 383-399.
- Paerl, H. W. (2000).** Marine Planckton En: *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space* (Editores B. A. Whitton y M. Potts) *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands. Págs. 121-148.
- Palinska, K. A., Thomasius, C. F., Marquardt, J. y Golubic, S. (2006).** Phylogenetic evaluation of cyanobacteria preserved as historic herbarium exsiccate. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2253–2263.
- Palinska, K. A. y Marquardt, J. (2008).** Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales). *Arch Microbiol* **189**, 325-335.
- Papaefthimiou, D., Hrouzek, P., Mugnai, M.A., Lukesova, A., Turicchia, S., Rasmussen, U. y Ventura, S. (2008).** Differential patterns of evolution and distribution of the symbiotic behaviour in nostocacean cyanobacteria. *Int J System Evol Microbiol* **58**:553-564.
- Pasternak, A., Hillebrand, H. y Flöder, S. (2009).** Competition between benthic and pelagic microalgae for phosphorus and light – long-term experiments using artificial Substrates. *Aquat Sci* **71**: 238-249.
- Pelroy, R. A. y Bassham, J. A. (1972).** Photosynthesis and dark carbon metabolism in intracellular bluegreen algae. *Arch Microbiol* **86**, 25-28.
- Pentecost, A. y Whitton, B. A. (2000).** Limestones. En: *The Ecology of Cyanobacteria*, págs. 233-255 (Eds. B. A. Whitton, M. Potts) *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands.
- Perona, E., Bonilla, I. y Mateo, P. (1998).** Epilithic cyanobacterial communities and water quality: an alternative tool for monitoring eutrophication in the Alberche River (Spain). *J Appl Phycol* **10**, 183-191.
- Perona, E., Bonilla, I. y Mateo, P. (1999).** Spatial and temporal changes in water quality in a Spanish river. *Sci Total Environ* **241**, 75-90.
- Perona, E., y Mateo P. (2006).** Benthic cyanobacterial assemblages as indicators of nutrient enrichment regimes in a Spanish river. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **34**:67–72.

- Perona, E., Aboal, M., Bonilla, I. y Mateo, P. (2003).** Cyanobacterial diversity in a Spanish river determined by means of isolation of cultures. Morphological variability of isolates in relation to natural populations. *Arch Hydrobiol Algol Stud* **109**, 475–86.
- Pfeiffer, C. y Palinska, K. (2002).** Characterization of marine Phormidium isolates-conformity between molecular and ecophysiological results. *J Plant Physiol* **159**, 591-598.
- Porta, D. y Hernández-Maríné (2005).** Structural and ultrastructural characterization of several culture strains assigned to *Oscillatoria* and *Lyngbya* (Cyanophyta/Cyanoprokaryota/Cyanobacteria) *Alg Stud* **117**, 349-370.
- Porteus, I. A., Seidler, R. J. y Watrud, L. S. (1997).** An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol Ecol* **6**, 787-791.
- Prat, N. (1991).** Present trends in river studies. En: Homage to Ramón Margalef; Why there is such pleasure in studying nature (Eds. J. D. Ros y N. Prat). *Oecologia Aquat* **10**: 1-12.
- Prézelin B. B., Glover H. E., Campbell L. (1987).** Effects of light intensity and nutrient availability on diel patterns of cell metabolism and growth in populations of *Synechococcus* spp. *Mar Biol* **95**:469–480.
- Prygiel J., Whitton, B. A. Bukowska, J. (Eds). (1999).** *Use of algae for monitoring rivers III*. Agence de l'eau Artois-Picardie, Douai, France. 372 pags.
- Quesada, A., y Vincent, W. E. (1997).** Strategies of adaptation by Antarctic cyanobacteria to ultraviolet radiation. *Eur J Phycol* **32**, 335-342.
- Quesada, A., Moreno, E., Carrasco, D., Paniagua, T., Wormer, L., De Hoyos, C. y Sukenik, A.(2006).** Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *Eur J Phycol* **41** (1), 39-45.
- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kaštovská, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek, J. y Sivonen, K. (2005).** Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *Int J System Evol Microbiol* **55**:11-26.
- Rajaniemi-Wacklin, P., Rantala, A., Kuuppo, P., Haukka, K. y Sivonen, K. (2008).** Cyanobacterial community composition in shallow, eutrophic Lake Tuusulanjärvi studied by microscopy, strain isolation, DGGE and cloning. *Arch Hydrobiol Suppl* **126**: 137-157.
- Rasmussen, U. y Svenning, M. M. (2001).** Characterization by genotypic methods of symbiotic *Nostoc* strains isolated from five species of *Gunnera*. *Arch Microbiol* **176**, 204–210.
- Reed D. R. H., Warr, S. R. C. y Kerby, N. W. (1986).** Osmotic shock-induced release of low-molecular-weight metabolites from free-living and immobilized cyanobacteria. *Enzyme Microb Technol* **8**(2),101-104.
- Reynolds, C. S. (2007).** Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. *Hydrobiol* **578**: 37–45.
- Ricart, M., Barceló, D., Geiszinger, A., Guasch, H., López de Alda, M., Román, A. M., Vidala, G., Villagrasa, M., Sabater, S. (2009).** Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. *Chemosphere* **76** (10): 1392–1401.
- Rippka, R. (1988a).** Recognition and identification of cyanobacteria. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 167. *Cyanobacteria*, págs. 28-67 (Eds. L. Packer y A.N. Glazer). *Academic Press*, New York.
- Rippka, R. (1988b).** Isolation and Purification of Cyanobacteria. *Methods in Enzymology*. **167**, 3-27.
- Rippka, R y Cohen-Bazire, G. (1983).** The Cyanobacteriales: a legitimate order based on the type strain *Cyanobacterium stanieri*? – *Ann Microbiol* (Inst. Pasteur) **134B**, 21-36.

- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B. Herdman, M. y Stanier, R. Y. (1979).** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **111**, 1-61.
- Rippka, R., Castenholz, R. W. y Herdman, M. (2001).** Form-genus IV. *Cyanobium* Rippka and Cohen-Bazire 1983. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd 3edn, Vol.1, pp. 498-499. Editado por D.R. Boone, R.W. Castenholz y G.M. Garrity. New York: Springer.
- Robertson, B. R., Tezuka, N. y Watanabe, M. M. (2001).** Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:861-871.
- Rodríguez-Gómez, V. (2004).** Análisis comparativo de técnicas para estudios de biomonitorización de la calidad del agua en ríos utilizando cianobacterias. Documento para la Obtención del Diploma de Estudios Avanzados. Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid.
- Rodríguez, V., Aguirre de Cárcer, D., Loza, V., Perona, E. y Mateo, P. (2007).** A molecular fingerprint technique to detect pollution-related changes in river cyanobacterial diversity. *J Environ Qual* **36**, 464-468.
- Rodríguez-López, M. y Vázquez, D. (1968).** Comparative studies on cytoplasmic ribosomes from algae. *Life Sci* **7**, 327-336.
- Roeselers, G., van Loosdrecht, M.C.M. y Muyzer, G. (2007).** Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. *Microbial Ecol* **54**: 578-585.
- Rother, J. A. y Fay, P. (1977).** Sporulation and the development of planktonic blue-green algae into Salopian meres. *Proc R Soc Lond B* **196**, 317-332.
- Rott, E., Pfister, P. (1988).** Natural epilithic algal communities in fast-flowing mountain streams and rivers and some man-induced changes. *Verh. Internat. Verein. Limnol* **23**: 1320-1324
- Rott, E., Hofmann, G., Pall, K., Pfister, P., Pipp, E. (Eds.) (1997).** Indikationslisten für Aufwuchsalgen In Österreichischen Fließgewässern. Teil 1: Saprobielle Indikation. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Austria.
- Rudi, K. y Jakobsen, K. S. (1997).** Cyanobacterial tRNA (Leu) (UAA) group I introns have polyphyletic origin. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 293-298.
- Rudi, K., Skulberg, O. M. y Jakobsen, K. S. (1998).** Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phylogenetically related strains. *J Bacteriol* **180**, 3453-3461.
- Rudi, K., Fossheim, T. y Jakobsen, K. S. (2002).** Nested evolution of a tRNA (Leu)(UAA) Group I intron by both horizontal intron transfer and recombination of the entire tRNA Locus. *J Bacteriol* **184**, 666-671.
- Sabater, S., Sabater, F., Tomas, X. (1987).** Water quality and diatom communities in two catalan rivers (N. E. Spain). *Wat Res* **21**, 901-911.
- Sabater, S., Armengol, J., Sabater, F., Comas, E., Urrutia, I. y Urrizalqui, I. (2000).** Algal biomass in a disturbed Atlantic river: water quality relationships and environmental implications. *Sci Total Environ* **263**,185-95.
- Sabater, S., Vilalta, E., Gaudes, A., Guasch, H., Muñoz, I. y Romaní, A. (2003).** Ecological implications of mass growth of benthic cyanobacteria in rivers. *Aquat Microbiol Ecol* **32**(2),175-184.
- Sabater S., Feio, M. J., Graça, M. A. S, Muñoz, I. y Romaní A. (2009).** The Iberian Rivers. En: *Rivers of Europe*. Editado por K. Tockner, Ch. Robinson, U. Uhlinger Elsevier.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2^a edición. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Sánchez-Baracaldo, P., Handley, B.A. y Hayes, P.K. (2008).** Picocyanobacterial community structure of freshwater lakes and the Baltic Sea revealed by phylogenetic analyses and clade-specific quantitative PCR. *Microbiol* **154**: 3347–3357.
- Sánchez-García, L. (2002).** Monitorización de la calidad del agua de los ríos Jarama y Guadalix a su paso por la Comunidad de Madrid. Proyecto Fin de Carrera, Universidad Autónoma de Madrid.
- Sanchis, D., Carrasco, D., Padilla, C. Leganés, F. Fernández-Valiente, E. del Campo, F. F., Quesada, A. (2002).** Spatial and temporal heterogeneity in succession of cyanobacterial blooms in a Spanish reservoir. *Ann Limnol-Int J Lim* **38** (3), 173-183.
- Sanguinetti, C. J., Neto, E. D. y Simpson, A. J. G. (1994).** Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **17**, 914-918.
- Santegoeds, C. M., Nold, S. C. y Ward, D. M. (1999).** Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacterial mat. *Appl Environ Microbiol* **62**(11),3922-3928.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987).** The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4** (4), 406-425.
- Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Muhling, M., Whitton, B. A., Belay, A. y Wilmotte, A. (1999).** *Arthrospira* ('*spirulina*') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiol Lett* **172**, 213-222.
- Schiaffino, M.R., Unrein, F., Gasol, J.M., Farias, M.E., Estevez, C., Balagué, V. e Izaguirre, I. (2009).** Comparative analysis of bacterioplankton assemblages from maritime Antarctic freshwater lakes with contrasting trophic status. *Polar Biol* **32**, 923–936.
- Schiefer, W., Schütz, K., Hachtel, W. y Happe, T. (2002).** Molecular cloning and characterization of *hetR* genes from filamentous cyanobacteria, BBA—*Gene Struct Expr* **1577**, 139–143.
- Schindler, D.W. (1997).** Evolution of phosphorous limitation in lakes. *Science* **195**,260-262.
- Schmetterer, J. (1994).** Cyanobacterial respiration. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Págs. 409-435. (Ed. A. Bryant). *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands.
- Schmutz, S., Cowx, I. G., Haidvogel, G. y Pont, D. (2007).** Fish-based methods for assessing European running waters: a synthesis. *Fish Manage Ecol* **14**:369–80.
- Schneider, S. y A, Melzer. (2003).** The trophic index of macrophytes (TIM)—a new tool for indicating the trophic state of running waters. *Int Rev Hydrobiol* **88**, 49–67.
- Schneider, S.C. y Lindstrøm, E.A. (2011).** The periphyton index of trophic status PIT: a new eutrophication metric based on non-diatomaceous benthic algae in Nordic rivers. *Hydrobiol* doi: 10.1007/s10750-011-0614-7.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T. y Uchiyama, H. (2001).** A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis. *Biotechnol Lett* **23**, 1205-1208.
- Serrano, A., Mateo, P. y Perona, E. (2003).** Estructura y composición de la comunidad de cianobacterias bentónicas de un arroyo de montaña mediterráneo, el arroyo Mediano (Madrid). *Limnética* **23** (1-2), 85-96.
- Serrano, A., Mateo, P., Perona, E. (2004).** Estructura y composición de cianobacterias bentónicas de un arroyo de montaña mediterráneo, el arroyo Mediano (Madrid). *Limnética* **23**, No.1-2.
- Shachak, M., Jones C. G. y Granot, Y. (1987).** Herbivory in rocks and the weathering of a desert. *Science* **236**,1098–1099.

- Shannon, C.E. y Weaver, W. (1963).** *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press: Urbana, IL, USA.
- Sheffield, V. C., Coxt, D. R., Lerman, L. S. y Myers, R. M. (1989).** Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 232-236.
- Shehawy, R.M. y Kleiner, D. (2001).** Nitrogen limitation. Págs: 45-64. En: L.C. Rai y P. Gaur (eds.). *Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Shen, H. y Song, L. (2007).** Comparative studies on physiological responses to phosphorus in two phenotypes of bloom-forming *Microcystis*. *Hydrobiol* **592**, 475-486.
- Shively, J. M. (1988).** Inclusions: granules of polyglucose, polyphosphate, and poly-β-hydroxybutyrate. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 167. *Cyanobacteria*. Págs. 195-203. (Eds. L. Packer y A. N. Glazer). Academic Press, Inc. New York.
- Sidler, W. A. (1994).** Phycobilisome and phycobiliprotein structures. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Págs. 139-216. (Ed. A. Bryant). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Simon, R. D. (1987).** Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies. En: *The Cyanobacteria*. Págs. 199-225. (Eds. P. Fay y C. Van Baalen). Elsevier Science Publishers, Oxford.
- Sivonen, K. (1990).** Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl Environ Microbiol* **56**(9), 2658-2666.
- Sládeček, V. (1973).** System of water quality from the biological point of view. *Arch Hydrobiol* **7**, 1-218.
- Slavik, K., Peterson, B.J., Deegan, L.A., Bowden, W.B., Hershey, A.E. y Hobbie, J.E., (2004).** Long term responses of the Kuparuk river ecosystem to phosphorus fertilization. *Ecology* **85** (4), 939-954.
- Smith, A. J. (1982).** Modes of cyanobacterial carbon metabolism. En: *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, págs 47-85. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton). Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Smith, A. D. y Gilbert, J. J. (1995).** Spatial and temporal variability in filament length of a toxic cyanobacterium (*Anabaena affinis*). *Fresh Biol* **33**: 1-11.
- Smith, V. H., Tilman, G. D. y Nekola, J. C. (1999).** Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environ Pollut* **100**: 179-196.
- Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. (1973).** *Numerical taxonomy*. W.H. Truman, San Francisco.
- Sommer, U. (1985).** Comparison between steady state and nonsteady state competition: experiments with natural phytoplankton. *Limnol Oceanogr* **30**:335-46.
- Sommer, U. (1996)** Nutrient competition experiments with periphyton from the Baltic Sea. *Mar Ecol Prog Ser* **140**, 161-167.
- Soule, T., Garcia-Pichel, F y Stout, V. (2009).** Gene Expression Patterns Associated with the Biosynthesis of the Sunscreen Scytonemin in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in Response to UVA Radiation. *J Bacteriol* **191**, 4639-4646.
- Speksnijder, A. G. C. L., Kowalchuk, G. A., De Jong, S., Kline, E., Stephen, J. R. y Laanbroek, H. J. (2001).** Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5157-5169.
- Stackebrandt, E. y Goebel, B. M. (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846- 849.

Stackebrandt, E. y Ebers, J. (2006). Microbiology today. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* **33**, 152-155.

Stanier, R. Y. y Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cianobacteria. *Ann Rev Microbiol* **31**, 225-274.

Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mendez, M. Y Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order *Chroococcales*). *Bacteriol Rev* **35**, 225-274.

Starmach, K. (1966). Flora Slodkowodna Polski. *Cyanophyta Sinice. Glaukophyta-Glaukofity.* PolskaAkademia Nauk. Paustwawe Yuydawnintwo Nankowe. Warszawa. 806 pags.

Steunou, A. S., Bhaya, D., Bateson, M. M., Melendrez, M. C., Ward, D. M., Brecht, E., Peters, J.W., Kuhl, M. y Grossman, A. R. (2006). *In situ* analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** (7), 2398-2403.

Stevenson, R.J., Pan, Y., Manoylov, K.M., Parker, C.A., Larsen, D.P. y Herlihy, A.T., (2008). Development of diatom indicators of ecological conditions for streams of the western US. *J N Am Benthol Soc* **27**, 1000–1016.

Stewart, W. D. P. (1978). Nitrogen-fixing cyanobacteria and their associations with eukariotics plants. *Endeavour* **2**, 170-179.

Stewart, W. D. P. (1980). Some aspects of structure and function in N₂-fixing cyanobacteria. *Ann Rev Microbiol* **34**, 497-538.

Strunecký, O., Elster, J & Komárek, J. (2010). Phylogenetic relationships between geographically separate *Phormidium* cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions?. *Polar Biol* **33**:1419-1428.

Sturion, A. (2004). Abordages moleculares para detector cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil. Tesis, Universidade de São Paulo, Brasil.

Svenning, M. M., Eriksson, T. y Rasmussen, U. (2005). Phylogeny of symbiotic cyanobacteria within the genus *Nostoc* based on 16S rDNA sequence analyses. *Arch Microbiol* **183**, 19–26.

Suttle, C. A., Stockner, J. G. y Harrison, P. J. (1987). Effects of nutrient pulses on community structure and cell size of a freshwater phytoplankton assemblage in culture. *Can J Fish Aquat Sci* **44**, 1768–74.

Tajima, F. y Nei, M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* **1**, 269-285.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.

Tandeau de Marsac, N. y Houmard, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms . *FEMS Microbiol Rev* **104**, 119-190.

Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R y Wilmotte, A. (2003). Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl Environm Microbiol* **69** (9), 5157-5169.

Taton, A., Grubisic, S., Ertz, D., Hodgson, D. A., Piccardi, R., Biondi, N., Tredici, M. R., Mainini, M., Losi, D., Marinelli, F. y Wilmotte, A. (2006a). Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. *J Phycol* **42** (6), 1257-1270.

- Taton, A., Grubisic, S., Balthasart, P., Hodgson, D. A., Laybourn-Parry, J. y Wilmotte, A. (2006b).** Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *FEMS Microbiol Ecol* **57** (2), 272-289.
- Teaumroong, N., Innok, S., Chunleuchanon, S. y Boonkerd, N. (2002).** Diversity of nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: I. Morphology, physiology and genetic diversity. *World J Microbiol Biotech* **18**, 673–682.
- Ter Braak, C. J. E. (1985).** Correspondence analysis of incidence and abundance data: properties in terms of a unimodal response model. *Biometrics* **41**, 859 - 873.
- Ter Braak, C.J.E. (1986).** Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* **67**:1167-1179.
- Ter Braak C. J. E. (1991).** CANOCO: a FORTRAN program for canonical community ordination by correspondence analysis, principle components analysis and redundancy analysis. Agricultural math Group, Wageningen.
- Teske, A., Sigalevich, P., Cohen, Y. y Muyzer, G. (1996).** Molecular identification of bacteria from a co-culture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Appl Environ Microbiol* **62**(11):4210-4215.
- Thacker, R. W. y Paul, V. J. (2004).** Morphological, chemical, and genetic diversity of tropical marine cyanobacteria *Lyngbya* spp. and *Ssymploca* spp. (*oscillatoriales*). *Appl Environ Microbiol* **70** (6), 3305–3312.
- Thiel, T. (1994).** Genetic analysis of Cyanobacteria. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Págs. 581-611. (Ed. A. Bryant). *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands.
- Thiel, T., Bramble, J., Rogers, S. (1989).** Optimum conditions for growth of cyanobacteria on solid media. *FEMS Microbiol Lett* **61**: 27-32
- Tilman, D., Kilham, S. S y Kilham, P. (1982).** Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **13**, 349-372.
- Tomitani, A., Knoll, A. H., Cavanaugh, C. M. y Ohno, T. (2006).** The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular, phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** (14), 5442–5447.
- Tuomainen, J., Hietanen, S., Kuparinen, J., Martikainen, P. J. y Servomaa, K. (2006).** Community structure of the bacteria associated with *Nodularia* sp. (Cyanobacteria) aggregates in the Baltic Sea. *Microb Ecol* **52**, 513–522.
- Trudgill, S. T. (1987).** Bioerosion of intertidal limestone, Co. Clare, Eire- 3: Zonation, process and form. *Mar Geol* **74**, 111–121.
- Tuomainen, J., Hietanen, S., Kuparinen, J., Martikainen, P. J. y Servomaa, C. (2006).** Community structure of the bacteria associated with *Nodularia* sp. (Cyanobacteria) aggregates in the Baltic Sea. *Microb Ecol* **52**, 513–522.
- Turicchia, S., Ventura, S., Schütte, U., Soldati, E., Zielke, M. y Solheim, B. (2005).** Biodiversity of the cyanobacterial community in the foreland of the retreating glacier Midtre Lovénbreen, Spisbergen, Svalbard. *Arch Hydrobiol Suppl* **117**, 427-440.
- Turner, S. (1997).** Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. *Plant Sys Evol Suppl* **11**, 13-52.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W. y Palmer, J. D. (1999).** Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* **46**(4), 327-338.

- Uher, B., Aboal, M. y Kovacik, L. (2005).** Epilithic and chasmoendolithic phycoflora of monuments and buildings in South-Eastern Spain. *Crypto Algal* **26**: 275-308.
- United States Environmental Protection Agency (2000).** Nutrient Criteria. Technical Guidance Manual. Rivers and Streams. EPA-822-B-00-002. United States Environmental Protection Agency, Washington.
- Urbach, E., Robertson, D. & Chisholm, S. W. (1992).** Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* **355**, 267-9.
- Urbach, E., Scanlan, D.J., Distel, D.L., Waterbury, J.B. y Chisholm, S.W. (1998).** Rapid diversification of marine picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). *J Mol Evol* **46**:188-201.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. y Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, **60** (2), 407-438.
- Van Der Griten, E., Janssen, M., Simis, S. G. H., Barranguet, C. y Admiraal, W. (2004).** Phosphate regime structures species composition in cultured phototrophic biofilms. *Fresh Biol* **49**: 369-381.
- Van Dijk, G.M., van Liere, L. Admiraal, W., Bannink, B.A., Cappon, J.J. (1994).** Present state of the water quality of European rivers and implication for management. *Sci Total Environ* **145**: 187-195
- Velázquez, D., Rochera, C., Camacho, A. y Quesada, A. (2011).** Temperature effects on carbon and nitrogen metabolism in some Maritime Antarctic freshwater phototrophic communities. *Polar Biol* doi: 10.1007/s00300-011-0964-7.
- Vézie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J y Sivonen, K. (2002).** Effect of nitrogen and phosphorous on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains on intracellular microcystin concentrations. *Microb Ecol* **43**:443-454.
- Villaescusa, J. A., Casamayor, E.O., Rochera, C., Velázquez, D., Chicote, A., Quesada, A. y Camacho A. (2010).** A close link between bacterial community composition and environmental heterogeneity in maritime Antarctic lakes. *Int Microbiol* **13**:67-77.
- Vincent, W. F. (2000).** Cyanobacterial dominance in the polar regions. En: *The Ecology of Cyanobacteria* (eds. B.A. Whitton y M. Potts), *Kluwer Academic Publ.*, págs 321-340.
- Vinten, A. J. A., Artz, R. R. E., Thomas, N., Potts, J. M., Avery, L., Langan, S. J., Watson, H., Cook, Y., Taylor, C., Abel, C., Reid, E. y Singh, B. K. (2011).** Comparison of microbial community assays for the assessment of stream biofilm ecology. *J Microbiol Methods*. DOI:10.1016/j.mimet.2011.03.001.
- Vis, C., Cattaneo, A. y Hudon, C. (2008).** Shift from chlorophytes to cyanobacteria in benthic macroalgae along a gradient of nitrate depletion. *J Phycol* **44**:38-44.
- Walsby, A. E. (1974).** The extracellular products of *Anabaena cylindrica* Lemm. I- Isolation of a macromolecular pigment peptide complex and other components. *Br Phycol J* **9**, 371-381.
- Walsby, A. E. (1975).** Gas vesicles. *Ann Rev Plant Physiol* **26**, 427-439.
- Ward, D. M., R. Weller, y Bateson M. M. (1990).** 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**:63-65.
- Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C. y Bateson, M. M. (1998).** A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1353-1370.
- Waterbury, J. B. y Stainer, R. Y. (1977).** Two unicellular cyanobacteria which reproduce by budding. *Arch Microbiol* **115**, 249-257.

- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. y Truper, H. G. (1987). Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.
- Wheeler, P. A. y Kirchman, D. L. (1986). Utilization of inorganic and organic carbon by bacteria in marine systems. *Limnol Oceanogr* **31**:998-1009.
- Whitton, B.A. (1987). The biology of Rivulariaceae. En: *The Cyanobacteria*. Pág. 513-534 (Eds. P.Fay y C. Van Baalen). *Elsevier*, Oxford.
- Whitton, B. A. (1991a). Aims of monitoring. En: *Use of Algae for Monitoring Rivers*. (Eds. B.A. Whitton, E. Rott y G. Friedrich). Institut für Botanik Universität. Innsbruck, Austria. Pag.: 5-8.
- Whitton, B. A. (1991b). Use of phosphatase assays with algae to assess phosphorous status of aquatic environments. En: *Bioindicators and environmental management. Proceedings of the 6th Internatinal Bioindicators Symposium*. Págs. 295-310. (Eds. D. W. Jeffrey y B. Madden). *Academic Press*, Inc. New York
- Whitton, B. A. (1992). Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. En: *Photosynthetic Prokaryotes*. vol. 6, págs. 1-51. (Eds. N. H. Mann y N. G. Carr). *Biotechnology Handbooks*. *Plenum Press*. London.
- Whitton, B. A., (1999). Perspective on the use of phototrophs to monitor nutrients in running waters. *Aquatic Conserv Mar Freshw Ecosyst* **9**, 545-549.
- Whitton, B. A. (2002). Phylum Cyanophyta. En: *The freshwater algal flora of the British Isles*. An identification guide to freshwater and terrestrial algae. Págs 25-122. (Eds. D. M. John, B. A. Whitton, A. J. Brook) *Cambridge University Press*, UK.
- Whitton, B. A. y Potts, M. (1982). Marine littoral. En: *The Biology of Cyanobacteria*, págs. 515-542 (Eds. N.G. Carr y B.A. Whitton) Blackwell, Oxford.
- Whitton, B. A. y Kelly, M. G. (1995). Use of algae and other plants for monitoring rivers. *Aust J Ecol* **20**, 45-56.
- Whitton, B. A. y Rott, E. (Eds.) (1996). Use of algae for monitoring rivers II. Innsbruck, Inst. Bot. Univ. Innsbruck Austria. 196 págs.
- Whitton, B. A. y Potts, M. (2000). Introduction of cyanobacteria. En: *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space* (Editores B. A. Whitton y M. Potts) *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands. págs. 1-10.
- Whitton, B. A. y Hernández, I. (2000). Eds. En: *Phosphatases in the Environment*. *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands.
- Whitton, B. A., Clegg, E., Christmas, M., Gemmell, J. J. y Robinson, P. J. (1999). Development of phosphatase assay for monitoring nutrients in rivers: Methodology manual for measurement of phosphates activity in mosses and green algae in rivers. *Environment Agency of England and Wales* STRE106-E-P págs 53. WRc, Frankland Road, Swindon, Wilts, UK.
- Whitton, B. A., Al-Shehri, A. M., Ellwood, N. T. W. y Turner, B. L. (2005). Ecological aspects of phosphatase activity in cyanobacteria, eukaryotic algae and bryophytes. En: *Organic Phosphatase in the Environment*. Capítulo 10, págs. 205-242 (Eds. B. L. Turner, E. Frossard y D. S. Baldwin) *CABI*, Wallingford, UK.
- Widmer, F., Shaffer, B. T., Porteos, A. y Seidler, R. J. (2006). Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Appl Environ Microbiol* **65** (2), 374-380.
- Wilkinson, C. R. y Fay, P. (1979). Nitrogen-fixation in coral-reef sponges with symbiotic cyanobacteria.

Nature **279** (5713), 527-529.

Willame, R., Boutte, C., Grubisic, S., Wilmotte, A., Komarek, J. y Hoffmann, L. (2006). Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *J Phycol* **42** (6):1312-1332.

Wilmotte, A. (1994). Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria, págs. 1-25. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. (Ed. D. A. Bryant) Kluwe Academic Publishers, The Netherlands.

Wilmotte, A. y Golubić, S. (1991). Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. *Arch Hydrobiol/Algol Stud* **64**, 1-24.

Wilmotte, A., Turner, S., Van de Peer, Y. y Pace, N.R. (1992). Taxonomic study of marine oscillatoriaceas strains (Cyanobacteria) with narrow trichomes. II. Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA. *J Phycol* **28**, 828-838.

Wilmotte, A., Van der Auwera, G. y de Wachter, R. (1993). Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF ('*Mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEMS Microbiol Lett* **317**, 96-100.

Wilmotte, A., Neefs, J. M. y De Wachter, R. (1994). Evolutionary affiliation of the marine nitrogenfixing cyanobacterium *Trichodesmium* sp strain NIBB-1067, derived by 16S ribosomal RNA sequence analysis. *Microbiology* **140** (8), 2159-2164.

Wilmotte, A., Stam, W.T., y Demoulin, V. (1997). Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (Cyanophyceae, Cyanobacteria) with narrow trichomes. III. DNA-DNA hybridization studies and taxonomic conclusion. *Arch. Hydrobiol./Algol Stud* **87**, 1-18.

Wilson, K. M., Schembri, M. A., Baker, P. D. y Saint, C. P. (2000). Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Appl Environ Microbiol* **66**, 332-338.

Wintzingerode, F., Göbel, U. B. y Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 213-229.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-71.

Wolk, C. P., Ernst, A. y Elia, J. (1994). Heterocyst metabolism and development. En: *The Biology of Cyanobacteria*. Págs. 769-823 (Ed. A. Bryant). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Wood, P., Peat, A. y Whitton, B. A. (1986). Influence of phosphorous status on fine structure of the cyanobacterium (blue-green alga) *Calothrix parietina*. *Cytobios* **47**, 89-99

Xu, M. Q., Kathe, S. D., Goodrich-Blair, H., Nierzwicki-Bauer, S. A. y Shub, D. A. (1990). Bacterial origin of a chloroplast intron: conserved self-splicing group I introns in cyanobacteria. *Science* **250**, 1566-1570.

Yannarell, A. R., Steppe, T.F., Paerl, H. W. (2006). Genetic variance in the composition of two functional groups (diazotrophs and cyanobacteria) from a hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol* **72** (2), 1207-1217.

Zapomělová E., Hisem, D., Rěháková, K., Hrouzek P., Jezberová J., Komárková J. Korelusová J. y Znachor, P. (2008). Experimental comparison of phenotypical plasticity and growth demands of two strains from *Anabaena circinalis*/ *A. crassa* complex (cyanobacteria). *J Plankton Res* **30**:1257-1269.

Zapomělová E., Jezberová J., Hrouzek P., Hisem, D., Rěháková, K., Komárková J. (2009). Polyphasic characterization of three strains of *Anabaena reniformis* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (cyanobacteria) and their reclassification to *Sphaerospermum* Gen. Nov. (Incl. *Anabaena kisseleviana*). *J Phycol* **45**: 1363-1373

Zeidner, G. y Béja, O. (2004). The use of DGGE analyses to explore eastern Mediterranean and Red Sea marine picophytoplankton assemblages. *Environ Microbiol* **6** (5), 528–534.

Zhu, W., Wan, L. y Zhao, L. (2010). Effect of nutrient level on phytoplankton community structure in different water bodies. *J Environ Sci* **22**(1): 32–39.